

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Susana d'Avila

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL
DA ESTOMATITE POR PRÓTESE**

Araraquara

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Susana d'Ávila

Avaliação Clínica e Laboratorial da
Estomatite por Prótese.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral - Área de Prótese.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Regina Sposto

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes
Giannini

Araraquara

2006

D'Avila, Susana

Avaliação clínica e laboratorial da estomatite por prótese /
Susana d'Avila. – Araraquara: [s.n.], 2006.
153 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Spoto

1. Estomatite sob prótese 2. Candida 3. Tipagem e reações
cruzadas sanguíneas 4. Técnicas de tipificação micológica
5. Biologia molecular I. Título.

SUSANA D'AVILA

Avaliação Clínica e Laboratorial da Estomatite por Prótese

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Maria Regina Sposto

2º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

3º Examinador: Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge

4º Examinador: Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo

5º Examinador: Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

Araraquara, 23 de Agosto de 2006.

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

A quem deposito toda minha confiança. Meu conselheiro, ouvinte e minha fonte individual de força e inspiração. Muito obrigada por permitir mais essa conquista. Sei que por mais que eu agradeça suas bênçãos, nunca será o suficiente...

Ao Espírito Santo e a todos os Santos,

chamados nos momentos de dificuldades....

Este trabalho é dedicado à ...

Meus pais, Luiz André e Odete,

Que não se contentaram em me presentear apenas com o mais precioso dos dons: a vida. Batalharam, investiram, acreditaram, compartilharam e me fizeram sentir capaz de conseguir. Essa é mais uma conquista que divido com vocês. Obrigada. Amo muito vocês!

Minhas irmãs, Andréa, Adriane e Rosana,

Meus sobrinhos, Giovana, Nathália e Gabriel,

Meu cunhado, Silvio César,

pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Souberam compreender minha ausência e tornaram essa caminhada mais agradável. Muito obrigada. Especialmente, as minhas irmãs, que também se sacrificaram para transformar meu sonho em realidade.

Minha segunda família: meus sogros Awad e Sabah, meus cunhados Sami e Geovana, Samira e Ricardo e minha sobrinha caçula Sofia, que também me apoiaram, incentivaram e souberam compreender os momentos de ausência, muitas vezes, extendidos ao Jamil.

Meu marido, Jamil Awad Shibli (habibit), que me incentivou a iniciar, continuar e finalizar a Pós Graduação, me ajudando em TODAS as etapas dessa caminhada, com carinho, dedicação e muita, mas muita paciência. Sua motivação, apoio e horas extras trabalhadas na bancada, apenas resumem seu companheirismo, cumplicidade e doação. Obrigada por acreditar em mim, mesmo nas vezes em que eu já tinha desistido. Te amo! Sem você esse trabalho não existiria.

Agradecimentos especiais

A minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Maria Regina Sposto, que com muita dedicação e paciência soube transmitir seus conhecimentos. Seu incentivo, determinação, capacidade e entusiasmo geraram todo este trabalho. O aprendizado foi difícil, mas acredito ter conseguido um crescimento e amadurecimento científico-pessoal (eu acho!). É com grande carinho que agradeço todo seu apoio e confiança, e expresso minha admiração e orgulho por sua orientação. Muito obrigada!

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, responsável pelo Laboratório de Micologia Clínica que generosamente me acolheu, tornando-me parte de sua equipe (agradeço esta honra). Seu conhecimento e competência me guiaram nesta empreitada e tornaram possível o desenvolvimento de toda a etapa laboratorial.

À Elaine Toscano Miranda e Rosângela Aparecida Moraes da Silva (Rô), duas pessoas excepcionais com quem tive a honra de conviver. Agradeço o carinho com que me receberam e todo o apoio que me proporcionaram nesta caminhada. Vocês foram meu alicerce....

À Roberta de Abreu Venâncio, Ronaldo Tamanini e Renata Venâncio, que participaram desta fase de pós-graduação, compartilhando problemas, dificuldades e claro, as conquistas. Sinto saudades...

À Fabiana Cristina Donofrio, que me acolheu com carinho em sua casa, me oferecendo sua amizade, me socorrendo física e emocionalmente, me fazendo companhia nas horas extras trabalhadas. Obrigada por tudo.

Ao Marcelo T. Matsumoto, meu anjo da guarda nos momentos de dificuldade, dúvidas e desespero. Um amigo que também compartilhou os momentos de alegrias e tornou minha estada no Laboratório mais produtiva e divertida.

À Lilian Cristina Baeza, que em vários momentos compartilhou sua companhia e seus conhecimentos comigo, tornando possível a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite, Elza Regina Manzolli Leite e Miriane da Costa, do Hemonúcleo Regional de Araraquara Profa. Dra. Clara Pechmann Mendonça, pertencente ao Núcleo de Atendimento à Comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, responsáveis pela realização dos exames de sangue, pela colaboração e ensinamentos. Um agradecimento especial à Elza R. M. Leite por seu conhecimento, didática, disponibilidade e paciência.

Aos indivíduos que aceitaram participar deste estudo, permitindo que uma idéia se transformasse em resultados.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, representada por sua Diretora, Profa. Dra. Rosimary Adriana Chiéríci Marcantonio, e Vice-Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de Prótese, Prof. Dr. Gelson Luis Adabo, e a todos os docentes do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese: Ana Claudia Pavarina, Ana Lucia Machado, Carlos Alberto Cruz, Carlos Eduardo Vergani, Cinara Camparis, Eunice Giampaolo, Francisco de Assis Mollo Jr., Francisco Guedes P. de Alencar Jr., Ivan R. Farias, João Arioli Filho, José Cláudio M. Segalla, Lígia A. P. Pinelli, Luiz Geraldo Vaz, Marco Antonio Compagnoni, Regina H. B. da Silva, Renata G. Fonseca, Sérgio Russi, Sérgio Sualdini Nogueira, pela formação, exemplo e convívio.

As Professoras da Medicina Bucal, Prof^a Dr^a Maria Regina Sposto, Prof^a Dr^a Claudia Navarro, Prof^a Dr^a Míriam Onofre e Prof^a Dr^a Elaine Massucato, pelo convívio e aprendizado dispensados.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese: Adelaide, Adelaidinha, Ângela, Cida, Cláudio, Dulce, Inês, João Vitor, Junior, Lucia, Malu, Manoel, Marta, Moacir, Silvia e Zé Carlinhos.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Alessandro, André, Eduardo, Fabiana, Fabiano, Janaina, Karin, Max, Nara, Raphael, Rosangela, Sabrina, Sicknan, Túlio, Vanessa, Weber e em especial à Roberta de Abreu Venâncio, pela amizade e convívio.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, Ana Carolina (Pi), Elaine, Eliana, Fabiana, José Nelson, Juliana Monteiro, Julhiany, Juliana, Lílian, Liliana, Marcelo, Marisa, Natália, Patrícia, Paula, Rosângela e Tirene, pelo convívio, amizade e apoio.

Ao casal Patrícia e Carlos Augusto pelo apoio nas horas de “abandono” e pela amizade sincera.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Mara, Rosângela, Flávia e Alexandre, pela atenção e carinho com que nos tratam.

Aos funcionários da biblioteca, Adriano, Ceres, Eliane, Eliane Cristina, Maria Aparecida, Marlei, Odete, Silvia e especialmente a Maria Helena, pela sua competência, atenção e dedicação.

À FAPESP, pela concessão de Bolsa de Mestrado (01/04330-8), Auxílio Pesquisa (02/04728-4) e Bolsa de Doutorado (03/04123-8).

À Fundunesp, pela concessão de Auxílio Pesquisa (803/02-DFP).

Aos protéticos Eleuze Cardoso e Fernando pela preparação dos corpos de prova.

A todos que de alguma forma colaboraram para a execução deste estudo.

SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
LISTA DE QUADROS E FIGURAS.....	16
LISTA DE TABELAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 PROPOSIÇÃO.....	31
3 MATERIAL E MÉTODO.....	33
3.1 Seleção dos indivíduos.....	33
3.2 Procedimentos clínicos	
3.2.1 Anamnese.....	34
3.2.2 Exame clínico intra-bucal.....	34
3.2.3 Exame das próteses	
3.2.3.1 Qualidade das próteses totais superiores.....	37
3.2.3.2 Higiene das próteses totais superiores.....	38
3.2.4 Coleta micológica.....	39
3.3 Procedimentos laboratoriais	
3.3.1 Isolamento de <i>Candida</i>	40
3.3.2 Identificação das espécies de <i>Candida</i>	41
3.3.3 Extração de DNA.....	42
3.3.4 Análise Genética.....	43
3.3.5 Preparação dos corpos-de-prova de acrílico para adesão da <i>Candida</i> spp.....	46
3.3.6 Identificação do grupo sanguíneo.....	49
3.4 Análise Estatística.....	51
4 RESULTADO.....	53
4.1 Anamnese e história odontológica.....	53

4.2 Exame clínico intra bucal.....	55
4.3 Avaliação das próteses totais superiores.....	55
4.4 Análise micológica.....	58
4.5 Análise genética.....	63
4.6 Análise da adesão.....	88
4.7 Análise do grupo sanguíneo.....	90
4.8 Interação entre os dados.....	91
4.8.1 Anamnese e história odontológica.....	91
4.8.2 Exame clínico intra bucal.....	96
4.8.3 Avaliação das próteses totais superiores.....	96
4.8.4 Análise micológica.....	98
4.8.5 Análise genética.....	98
4.8.6 Análise da adesão.....	101
4.8.7 Análise do grupo sanguíneo.....	102
5 DISCUSSÃO.....	106
6 CONCLUSÃO.....	129
7 REFERÊNCIAS.....	131
8 ANEXO.....	145
RESUMO.....	150
ABSTRACT.....	153

PREFÁCIO

Este trabalho foi financiado por:

- 1- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – por meio de Bolsa Mestrado (01/04330-8), Auxílio Pesquisa (02/04728-4) e Bolsa de Doutorado (03/04123-8).
- 2- Fundação de Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) – por meio de Auxílio Pesquisa (803/02-DFP).
- 3- Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese e Pró Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa (auxílio PROAP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.
- 4- Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.
- 5- Hemonúcleo Regional de Araraquara Profa. Dra. Clara Pechmann Mendonça, pertencente ao Núcleo de Atendimento à Comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **EP** – Estomatite por Prótese
- **PT** – Prótese Total
- **P** - Palato
- **L** – Língua
- **GT** - Grupo Teste
- **GC** - Grupo Controle
- **CPOD** – Cariados-Perdidos-Obturados-Dentes
- **OMS** - Organização Mundial de Saúde
- **ssp.** – *species*
- **%** - porcentagem
- **°C** – grau Celcius
- **pH** – potencial hidrogeniônico
- **µL** – microlitro
- **mM** – milimolar
- **µg** – micrograma
- **mL** – mililitro
- **pmol** – picomol
- **ng** – nanograma
- **mm** – milímetro
- **cm** - centímetro
- **MM** – massa molecular
- **rpm** – rotações por minuto
- **nm** – nanômetro
- **1x** – concentração para uso normal
- **pb** – pares de base
- **DNA** – ácido desoxirribonucléico
- **dNTP** – desoxirribonucleotídeo
- **A** – adenina
- **T** – timina

- **C** – citosina
- **G** – guanina
- **RAPD** – Polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente ou *Random Amplified Polymorphyc DNA*
- **RFLP** – Polimorfismo no fragmento de restrição
- **PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- **REA** – Análise com endonuclease de restrição
- **UPGMA** – Unweighted Pair-Group Method, Arithematic averages
- **Tris** – tri (hidroximetil) aminometano
- **EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- **TBE** – Tris / ácido bórico / EDTA
- **YPD** – Yeast / peptone / dextrose
- **Hz** - Hertz
- **MgCl₂** - Cloreto de magnésio
- **KCl** - Cloreto de Potássio
- **cepa ATCC** - American Type Culture Collection

LISTA QUADROS E FIGURAS

QUADRO 1 – Padrão para leitura da tipagem direta e reversa dos antígenos ABO.....	50
FIGURA 1 – Figura representativa de prótese total dividida em sextantes utilizada para avaliação da higienização.....	39
FIGURA 2 – Cultura em CHROMagar Candida após 48 horas (verde para <i>C. albicans</i> e rosa para outra espécie não identificada pelo meio seletivo).....	40
FIGURA 3 – FIGURA 3 – Cultura em CHROMagar Candida após 48 horas (rosa e branco: espécies não identificadas pelo meio seletivo).....	40
FIGURA 4 – Padronização das amostras com os iniciadores 1, 2 e 3 (kit Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences), em gel de agarose 2%, após 2 horas, à 150 volts.....	44
FIGURA 5 – Padronização das amostras com os iniciadores 4, 5 e 6 (kit Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences), em gel de agarose 2%, após 2 horas, à 150 volts.....	44
FIGURA 6 – Padrão de amplificação dos iniciadores OPE-03 e OPA-03 (Operon Technologies), em gel de agarose 2%, após 2 horas, à 150 volts.....	45
FIGURA 7 – Observação em microscopia óptica (magnificação 400x) do corpo de prova de resina termopolimerizável – controle negativo.....	48
FIGURA 8 – Observação em microscopia óptica (magnificação 400x) do corpo de prova de resina termopolimerizável – controle positivo.....	48
FIGURA 9 - Observação da reação positiva de tipagem sangüínea para o antígeno Le ^b (setas).....	51
FIGURA 10 - Número de indivíduos segundo a qualidade das próteses totais superiores (<i>n</i> =60).....	57
FIGURA 11 - Percentual da distribuição das espécies de <i>Candida</i> identificadas nos indivíduos do grupo teste (<i>n</i> =60 indivíduos).....	58

FIGURA 12 - Percentual da distribuição das espécies de <i>Candida</i> identificadas nos indivíduos do grupo teste, segundo o sítio de coleta: palato, prótese total ou língua ($n=60$ indivíduos).....	59
FIGURA 13 - Percentual da distribuição das espécies de <i>Candida</i> identificadas nos indivíduos do grupo controle ($n= 18$ indivíduos).....	62
FIGURA 14 – Percentual da distribuição das espécies de <i>Candida</i> identificadas nos indivíduos do grupo controle, segundo o sítio de coleta: palato ou língua ($n= 18$ indivíduos).....	62
FIGURA 15 - Dendrograma dos isolados de <i>C. albicans</i> obtidos com o iniciador 4 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	67
FIGURA 16 - Dendrograma dos isolados de <i>C. albicans</i> obtidos com o iniciador 6 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	70
FIGURA 17 - Dendrograma dos isolados de <i>C. albicans</i> obtidos com o iniciador OPA-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	73
FIGURA 18 - Dendrograma dos isolados de <i>C. albicans</i> obtidos com o iniciador OPE-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	77
FIGURA 19 - Dendrograma dos isolados de <i>C. tropicalis</i> obtidos com o iniciador 4 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	79
FIGURA 20 - Dendrograma dos isolados de <i>C. tropicalis</i> obtidos com o iniciador 6 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	80
FIGURA 21 - Dendrograma dos isolados de <i>C. tropicalis</i> obtidos com o iniciador OPA-03 (Operon Techonologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	82

FIGURA 22 - Dendrograma dos isolados de <i>C. tropicalis</i> obtidos com o iniciador OPE-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	83
FIGURA 23 - Dendrograma dos isolados de <i>C. glabrata</i> obtidos com o iniciador 4 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	85
FIGURA 24 - Dendrograma dos isolados de <i>C. glabrata</i> obtidos com o iniciador 6 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	86
FIGURA 25 - Dendrograma dos isolados de <i>C. glabrata</i> obtidos com o iniciador OPA-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	87
FIGURA 26 - Dendrograma dos isolados de <i>C. glabrata</i> obtidos com o iniciador OPE-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).....	88
FIGURA 27 - Média e desvio padrão da contagem de células de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> aderidas em corpo de prova de resina termopolimerizável.....	89
FIGURA 28 - Média e desvio padrão da contagem de células de <i>C. albicans</i> de isolados provenientes de indivíduos do grupo teste e grupo controle, aderidas em corpo de prova de resina termopolimerizável.....	90
FIGURA 29 - Distribuição dos indivíduos do grupo teste ($n= 60$ indivíduos) de acordo com o tipo sanguíneo nos sistemas ABO e RH.....	91
FIGURA 30 - Distribuição dos indivíduos do grupo controle ($n=18$ indivíduos) de acordo com o tipo sanguíneo nos sistemas ABO e RH.....	91
FIGURA 31 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, relacionando doença sistêmica, uso de medicamento e fumo, à estomatite por prótese (EP) e detecção de <i>Candida</i> spp.....	93
FIGURA 32 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, segundo análise do grupo sanguíneo (sistemas ABO e RhD), estomatite por prótese (EP) e detecção de <i>Candida</i> spp.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Média $\pm$ desvio padrão (percentual dentro da amostra) das variáveis avaliadas para os grupos teste e controle.....	53
TABELA 2 - Hábitos de higiene em relação à cavidade bucal e à prótese total (PT) para os grupos teste e controle.....	54
TABELA 3 – Média dos índices utilizados para avaliação dos indivíduos do grupo controle ($n=18$ indivíduos).....	56
TABELA 4 – Análise dos indicadores da qualidade das próteses totais (PT).....	57
TABELA 5 – Identificação, distribuição e frequência das espécies de <i>Candida</i> nos isolados obtidos nos indivíduos do grupo teste ($n=60$ indivíduos).....	60
TABELA 6 – Identificação, distribuição e frequência das espécies de <i>Candida</i> nos isolados obtidos nos indivíduos do grupo controle.....	62
TABELA 7 – Distribuição e frequência dos indivíduos dos grupos teste e controle, de acordo com análise do tipo sanguíneo para antígenos dos sistemas ABO, RH e Lewis.....	91
TABELA 8 – Distribuição e frequência dos indivíduos para os grupos teste e controle, segundo o gênero.....	92
TABELA 9 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle quanto aos hábitos de higiene, diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção <i>Candida</i> spp.....	95
TABELA 10 - Frequência do uso das próteses totais relacionado à estomatite por prótese (EP) e detecção de <i>Candida</i> spp. nos indivíduos do grupo teste.....	97
TABELA 11 – Distribuição dos indivíduos do grupo teste, segundo a qualidade e higiene da prótese total (PT), diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção de <i>Candida</i> spp.....	97
TABELA 12 – Média do número de células aderidas por mm^2 em corpo de prova de resina termopolimerizável, para isolados de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> , nos indivíduos dos grupos teste e controle.....	102

TABELA 13 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, segundo análise do tipo sanguíneo Lewis, diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção *Candida* spp.....103

TABELA 14 - Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, segundo análise dos fenótipos ABO, RhD e Lewis, diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção *Candida* spp.....104

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Estomatite por prótese é um processo inflamatório que envolve a mucosa do palato quando esta é recoberta por prótese removível total ou parcial⁵. É uma diagnose clínica¹⁰⁸ com uma prevalência ampla, afetando uma faixa de 11 a 67% dos usuários de próteses removíveis^{39,90,94,116,117}, sendo esta variabilidade atribuída às diferentes populações estudadas, critérios de diagnóstico e metodologias aplicadas⁹².

A literatura reporta uma grande variedade de terminologias para se referir à doença: *estomatite por dentadura* ou *estomatite protética*^{10,12,16,25,45,52,58,59,61,73,103,104,113}, *candidíase eritematosa*²⁵, *boca irritada por dentadura (denture sore mouth)*^{14,25}, *estomatite por dentadura associada a Candida*^{6,26,70,92,102}, *estomatite induzida por dentadura*^{28,37,53,80,83}, *candidose oral associada ao uso de dentadura*¹⁸, *candidíase atrófica crônica*^{14,67} e *estomatite relacionada à dentadura*⁵. Entretanto, optamos por utilizar o termo Estomatite por Prótese Total (EP) por considerarmos o mais adequado, além de mais utilizado e universalmente aceito⁴.

A EP é frequentemente assintomática, mas pode apresentar sinais e sintomas como sangramento da mucosa, inchaço, sensação de ardência, prurido ou outra sensação dolorosa, halitose, gosto desagradável e boca seca⁴.

A etiologia da EP é desconhecida¹¹⁷, mas de acordo com a literatura pode ser multifatorial^{4,5,84,116,117}. Os fatores relacionados ao

hospedeiro podem ser divididos em fatores locais e fatores sistêmicos^{14,97}. Os fatores locais referem-se ao uso de próteses removíveis (principalmente próteses totais), oclusão e/ou adaptação insatisfatórias da prótese, uso contínuo e/ou material inadequado da prótese, higiene bucal e/ou da prótese inadequada, consumo de dieta rica em carboidratos e xerostomia^{4,5,54,60,61,85,108,117}. Os fatores sistêmicos estão relacionados à idade, antibioticoterapia, uso de corticosteróides, má nutrição, desordens endócrinas, doenças malignas e desordens imunológicas^{4,5,39,54,108}. Os fatores relacionados à prótese total (idade, qualidade e higiene) e à saúde sistêmica do indivíduo (doenças sistêmicas, uso de medicação e fumo) têm sido mais freqüentemente estudados^{36,58,61,85,104,108}. Entretanto, a EP também é considerada uma forma de infecção por *Candida* spp. caracterizando um quadro de candidose oral¹¹⁶. Desde que *Candida* spp. foi sugerida como um potencial agente causador da EP na década de 30, este fator etiológico vem sendo estudado por diversos pesquisadores^{4,25,28,53,58,60,94,103}.

Candida spp. é um fungo comensal presente na microbiota residente dos indivíduos saudáveis (de 25-50%) e de usuários de próteses removíveis (de 60 a 100%)^{42,90}. São microrganismos oportunistas que transitam da condição comensal para patológica quando há uma alteração do mecanismo homeostático normal entre hospedeiro e fungo⁴². Este desequilíbrio freqüentemente é relacionado à fatores do hospedeiro e raramente aos do fungo^{39,55,84}. Indivíduos que apresentam fatores locais

e/ou sistêmicos podem ser considerados como predisponentes à EP e apresentam maior número e diversidade de espécies de *Candida*^{3,54}.

Candida é um fungo heterogêneo, unicelular, sexuado ou assexuado (forma mais isolada de infecções), podendo exibir blastoconídeo, pseudohifas, hifas e outras estruturas^{39,110} exibindo ainda grande variação de fenótipo. *C. albicans* é a espécie mais comum isolada da cavidade oral e considerada a mais virulenta⁴⁸, sendo responsável por quase 70% dos isolados, embora outras espécies possam estar presentes, como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*⁹⁰ e *Candida dubliniensis*¹¹¹. Estas espécies também são reconhecidas como patógenos médicos importantes, podendo ser detectadas na cavidade oral de forma isolada ou simultânea^{20,48}.

Os resultados encontrados na literatura quanto ao cultivo de *Candida* spp. são bastante variados e provavelmente dependentes do método de coleta utilizado^{2,72,82}. No entanto, a técnica de impressão (*imprint*) com discos de papel parece ser adequada para estudos em superfícies de próteses e de mucosa bucal, sendo considerado o método quantitativo mais sensível, específico e confiável^{12,82}. Podemos observar ainda que o número de estudos^{5,8,27,30,31,34,41,42,48,94}, que utilizam o meio seletivo CHROMagar *Candida* e o teste de assimilação de açúcares API 20C AUX está aumentando na literatura, visando uma identificação mais

rápida e acurada dos isolados, facilitando o estudo do fungo e paralelamente tornando as metodologias mais semelhantes.

Os métodos clássicos permitem a identificação das espécies de *Candida* por meio de suas características morfológicas e bioquímicas. Adicionalmente, outras características como susceptibilidade, produção de proteínase, fosfolipase, entre outros, podem ser observadas. *Candida* spp. pode ser categorizada por seu fenótipo (sorotipo, biotipo, resistência e proteína) e mais recentemente por métodos de tipagem molecular, como cariotipagem, análise com endonuclease de restrição (REA), polimorfismo no fragmento de restrição (RFLP) e reação em cadeia da polimerase (PCR)⁴⁸. A tipagem por polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD), é uma ferramenta importante para o conhecimento e compreensão da patogenicidade do fungo. Esta metodologia permite investigar não apenas a identidade das espécies, como também novas espécies ou subgrupos, transmissão, persistência e resistência à antifúngicos de cepas ou de infecções, além da microevolução dentro de uma única cepa^{2,48,76}. É uma técnica de PCR baseada na geração de produtos de amplificação de um ácido nucléico por iniciadores curtos e arbitrários (9 a 10 bases), com baixa temperatura de anelamento (36°C). O resultado é a geração de produtos de amplificação que representam uma multiplicidade de sítios anônimos e que são características do genoma estudado^{23,33}. A técnica é rápida, requer menor quantidade de DNA e está sendo amplamente utilizada em

pesquisas, inclusive em estudos analisando amostras da cavidade bucal^{24,32,46,51,74,75,115}. Sua capacidade em discriminar isolados ou espécies é diretamente dependente da escolha dos iniciadores^{7,47}, devendo ser selecionados os iniciadores que promovam melhor variabilidade entre as espécies ou isolados¹⁰⁹, permitindo a análise das relações e diversidades genéticas.

Outro fator que parece ser relevante na patogênese da EP são os fatores de virulência da *Candida* spp., os quais podem promover o sucesso da colonização e/ou invasão dos tecidos do hospedeiro⁷¹. A virulência é determinada, em parte, pela capacidade de aderir e colonizar o acrílico da prótese e/ou células epiteliais da mucosa, quebrando as barreiras de proteção da mucosa bucal^{55,106}. Esta capacidade do fungo parece ser o passo inicial para a colonização e subsequente invasão dos tecidos bucais^{38,40,50,81,94} e pode variar segundo a espécie do fungo e tipo de substrato.

O acrílico das próteses tem um importante papel no aumento do risco de colonização por *Candida* spp., pois atua como um reservatório de microrganismos^{50,70}. O processo de adesão de *Candida* spp. em acrílico é complexo e fatores como higiene oral e da prótese deficientes, pH baixo sob as próteses, dieta rica em carboidratos, superfície celular da *Candida*, hidrofobicidade da superfície celular e energia livre da superfície do acrílico, modificam a adesão e colonização de *Candida* spp.⁵⁰.

Estudos indicam diferenças ou semelhanças na adesão entre *C. albicans* e *C. não albicans*^{66,87}, entre tipos de resinas⁴¹, entre superfícies lisas e polidas⁹³ e ausência ou presença de saliva^{70,94,113}. Produtos metabólicos extracelulares^{98,99}, presença de outros componentes como plasma¹¹⁸ e associações entre fungos e bactérias^{17,27,57,94,98} também tem sido consideradas no processo de adesão.

Embora a aderência de *Candida* spp. em superfície de resina acrílica ou superfícies sólidas seja mediada principalmente por essas interações não específicas, as proteínas adsorvidas do plasma ou da saliva por estas superfícies afetam a aderência de *Candida* e sugerem que essas proteínas adsorvidas atuem como sítios receptores específicos⁸¹.

Nesse contexto destacamos a adesão de *Candida* spp. nos tecidos bucais, que tem sido estudada de várias formas, entre elas, pela identificação do tipo sanguíneo dos indivíduos, utilizando os sistemas ABO, H e Lewis (LE).

Os sistemas ABO, RH, H, LE e secretor (SE) possuem genes independentes, no entanto, a expressão de seus antígenos estão estritamente relacionadas. Os antígenos dos sistemas ABO, H, RH e LE, quando expressos, podem ser encontrados nos eritrócitos e/ou fluidos, e no sistema SE, apenas nos fluidos. Desta forma, os indivíduos que expressam o antígeno H nos fluidos são chamados de secretores¹⁰⁷ (gene SeSe ou Sese) enquanto os que não expressam, de não secretores (gene

sese). No sistema LE os indivíduos com fenótipo eritrocitário Le (a+b-) ou Le^a são os não secretores e os que apresentam fenótipo Le (a-b+) ou Le^b são os secretores. Quando o indivíduo não for secretor ou não possuir o gene *LE* apresentará o fenótipo eritrocitário Le (a-b-). Neste caso, somente a avaliação de fluidos corpóreos, como a saliva, poderá identificar o estado secretor do indivíduo.

Antígenos do grupo sanguíneo ABO, H e LE são seqüências de açúcares imunodominantes, localizados no término da cadeia de alguns glicolípídeos e glicoproteínas¹⁰⁷. A adesão de *C. albicans* é mediada por interações específicas com esses açúcares como a D-manose, N-acetil D-glucosamina e L-fucose⁸¹, que atuam como receptores, podendo aumentar ou inibir a aderência do fungo^{21,107,112}. A capacidade de secretar esses antígenos pode ser considerada um mecanismo de defesa nato do hospedeiro^{11,69,112}.

Os antígenos do grupo sanguíneo ABO não estão confinados aos eritrócitos, podendo estar presentes em tecidos, células (incluindo células da mucosa epitelial)⁹ e secreções como saliva, lágrima, muco gástrico, entre outras^{21,29,44}. Os antígenos do grupo sanguíneo Lewis, diferindo dos outros, não são sintetizados nas células vermelhas. São antígenos solúveis presentes em secreções, como a saliva, e quando presentes no plasma são adsorvidos pelos eritrócitos⁴⁴.

A associação entre a inabilidade, determinada geneticamente, de secretar ABH e/ou Lewis e a susceptibilidade para certas infecções, como

EP e/ou detecção de *C. albicans*, têm sido estudadas^{9,11,19,78,107,112}. Apesar da relação entre detecção de *Candida* e grupo sanguíneo ou estado secretor de ABH e Lewis nem sempre ser encontrada¹⁰⁷, o tipo sanguíneo O e não secretor de ABH, é considerado como um fator de predisposição a EP^{19,78}, apresentando maior propensão e maior grau de severidade da doença⁸¹. A detecção de *C. albicans* em indivíduos deste grupo também é maior^{9,19}. Além disso, antígenos Le^a têm sido sugeridos como receptores para *Candida* spp.^{69,107}.

Apesar do intenso desenvolvimento de técnicas moleculares, o avanço da biotecnologia na identificação dos agentes etiológicos (in vitro) nem sempre tem sido transportado para a aplicação clínica, ou mais especificamente, tem sido utilizados em amostras clínicas (in vivo). Esta é a principal diferença da nossa proposta, caracterizando-a como de interesse e aplicação clínico-laboratorial.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

Este estudo se propôs a avaliar os fatores etiológicos relacionados à Estomatite por Prótese e suas correlações, por meio de avaliação clínica e laboratorial.

Objetivos específicos

Avaliar a associação entre:

- EP e a identificação das espécies de *Candida* presentes em portadores de prótese total,
- EP e as condições clínicas (doenças sistêmicas, uso de medicação e tabagismo) dos indivíduos,
- EP e o grupo sanguíneo dos indivíduos,
- EP e as características físicas e de uso da prótese total
- EP e as características de adesão e os genótipos de *Candida* spp..

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Seleção dos indivíduos

Foram selecionados 78 indivíduos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que aceitaram participar do estudo, de acordo com o Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), divididos em dois grupos:

- **Grupo Teste** ($n=60$ indivíduos): indivíduos desdentados totais (superior e inferior), portadores de Prótese Total (PT) superior (com no mínimo um ano de uso), portadores ou não de PT inferior e sem história de uso de antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos e antimicrobianos nos seis meses anteriores à consulta. Os indivíduos avaliados encontravam-se na lista de espera para troca das próteses totais nesta Faculdade, eliminando assim, uma amostra viciada, com indivíduos já instruídos, por exemplo, quanto a métodos de higienização local da mucosa e/ou da prótese, que poderiam interferir nos resultados obtidos, uma vez que alguns estudos relacionam essas variáveis à presença da infecção. Os indivíduos que não aceitaram participar do estudo foram avaliados clinicamente em um exame de rotina e, quando necessário, foram orientados e/ou encaminhados para tratamento nas clínicas desta faculdade.

- **Grupo Controle** ($n=18$ indivíduos): indivíduos >30 anos de idade, não usuários de próteses removíveis (parcial ou total), podendo apresentar-se total ou parcialmente dentado.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP (CEP-FO/CAr. Protocolo N° 54/04, de 13 de dezembro de 2004).

3.2 Procedimentos clínicos

3.2.1 Anamnese

Em uma Ficha Clínica foram coletados os dados pessoais e a história médica, considerando doenças atuais, uso de medicamentos e hábito de fumar. A história odontológica, no Grupo Teste, considerou a presença de sintomatologia relacionada à EP, tempo de experiência com PT, idade da prótese atual, tipo de material, frequência de uso, satisfação com a PT, hábitos de higienização com a prótese e com a cavidade bucal. Já para o Grupo Controle, a história odontológica considerou apenas a sintomatologia relacionada à infecção por *Candida* spp. (ardência ou sensação de “boca assada”, queimação ou calor, prurido e boca seca) e hábitos de higienização da cavidade bucal.

3.2.2 Exame clínico intra-bucal

- **Grupo Teste:** Foi realizado exame clínico para diagnóstico de EP na mucosa palatina, segundo a classificação de Newton⁷⁹ (1962). O exame da mucosa do rebordo inferior foi direcionado apenas para a presença ou ausência de sinais clínicos de infecção por *Candida* spp. (áreas avermelhadas, placas brancas, descamação de mucosa), com finalidade de tratamento da doença.

- **Grupo Controle:** Foi realizado exame clínico para identificar às condições dos dentes e do periodonto. A condição dentária foi avaliada por meio do índice Cariados-Perdidos-Obturados-Dentes (CPOD)⁵⁶. Foram avaliados todos os elementos dentários, com exceção dos terceiros molares, considerando as superfícies oclusal, vestibular, lingual, mesial e distal. Os critérios de diagnóstico foram estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e os códigos para preenchimento das fichas conforme publicado por Pinto⁸⁹ (1989), sendo:

- 0- dentes ausentes,
- 1- dentes cariados,
- 2- dentes restaurados,
- 3- dentes extraídos,
- 4- dentes com extração indicada,
- 5- dente hígido.

Ao final foram somados todos os valores obtidos entre cariados, restaurados, extraídos e com extração indicada para calcular o índice CPOD individual. O índice geral de CPOD foi calculado pela somatória de todos os CPODs e divididos pelo número total de indivíduos avaliados neste grupo. Dentes que apresentasse cavidades abertas foram excluídos de nossa amostra.

O estado periodontal foi avaliado nos elementos dentários⁹⁵ 16, 21, 24, 36, 41 e 44, por meio dos seguintes parâmetros clínicos:

- 1- Presença de biofilme: ausência ou presença de placa dentária por meio de sondagem exploratória¹.
- 2- Presença de sangramento marginal: ausência ou presença de sangramento marginal¹.
- 3- Profundidade de sondagem (mm): medida pela distância da margem gengival até o fundo da bolsa ou sulco gengival.
- 4- Sangramento à sondagem: ausência ou presença de sangramento até 30 segundos após a sondagem.
- 5- Recessão gengival (mm): medida pela distância da margem gengival a junção cimento-esmalte.
- 6- Nível clínico de inserção (mm): medida pela distância da junção cimento-esmalte até o fundo da bolsa ou sulco periodontal.

Na ausência de um dos elementos dentários citados, a avaliação foi realizada no elemento dental mais próximo. O exame periodontal foi realizado por um único examinador, previamente treinado por um periodontista. As medidas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção foram determinadas utilizando uma sonda periodontal manual do tipo Carolina do Norte (PCPUNC 15 Hu-friedy Mfg Co Inc. Chigago IL, EUA). As mensurações foram realizadas em 6 faces do dente: mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, médio-lingual e disto-lingual.

3.2.3 Exame das próteses

3.2.3.1 Qualidade das próteses totais superiores

A qualidade das próteses totais superiores foi avaliada com base em cinco indicadores, a partir de critérios adaptados de Rise⁹⁶ (1979), de forma somatória, sendo melhor a condição da prótese quanto menor a pontuação obtida para a mesma. Dessa forma, foram avaliados os seguintes indicadores: Defeitos, Material, Estabilidade, Retenção e Oclusão.

Defeitos: Pontuação 0 - Sem defeitos

Pontuação 1 - Defeitos pequenos: um ou dois dentes ausentes ou fraturados; perda menor que 1cm² da base da PT; rachaduras pequenas (menores que 2 cm) e deficiências da extensão da área chapeável.

Pontuação 2 - Defeitos médios: três ou mais dentes ausentes ou fraturados; perda maior que 1cm² da base da PT; rachaduras grandes (maiores que 2 cm), próteses totais imediatas ou dois defeitos pequenos.

Pontuação 3 - Defeitos grandes: fratura total da prótese, mais de um defeito médio.

Material: Foram consideradas condições como ranhuras ou porosidade cobrindo mais que 1/3 da base da PT, reembasamento deficiente ou provisório e pigmentação ou depósitos de cálculos extensos. O material da PT foi considerado satisfatório (pontuação 0) caso não apresentasse

nenhuma das condições acima e insatisfatório (pontuação 1) caso apresentasse alguma.

Estabilidade: Ao se pressionar a região de pré-molar de um lado da prótese, foi avaliada a ausência (pontuação 0) ou presença de báscula (pontuação 1) do lado oposto, segundo preconizado pela disciplina de Prótese Total da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

Retenção: Foi considerada satisfatória (pontuação 0) se a PT não deslocasse com moderada abertura bucal e insatisfatória (pontuação 1) se houvesse deslocamento. O indivíduo foi orientado a manter lábio e língua relaxados.

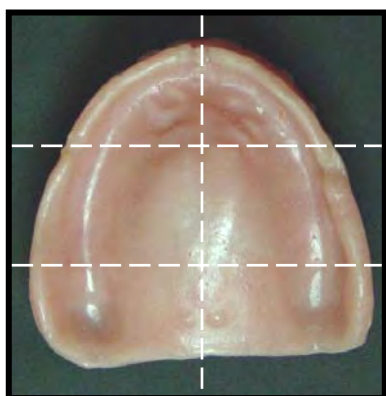
Oclusão: Foi considerada satisfatória (pontuação 0) se houvesse presença de pelo menos três pontos de contato oclusal, dois posteriores, bilateralmente, e um anterior. Na ausência, foi considerada insatisfatória (pontuação 1).

Para cada PT foi estabelecida uma pontuação que se deu pela soma dos resultados dos cinco indicadores, correspondendo a uma pontuação mínima de zero (prótese totalmente adequada) a máxima de 7 (prótese totalmente inadequada).

3.2.3.2 Higiene das próteses totais superiores (Índice de Placa)

Para verificação do grau de higienização das próteses foi proposto um índice³⁴, que dividiu as próteses em sextantes (Figura 1). Foi realizada aplicação de evidenciador de placa (eritrosina - Eviplac solução, 10 mL, Art Dent Ltda, Araraquara, SP, Brasil) na região interna da prótese total

superior. Em seguida a prótese foi enxaguada em água corrente e avaliada a retenção do corante. Na presença de qualquer resquício do evidenciador o sextante foi considerado corado. Assim, o índice qualificou, por meio da visualização do biofilme, o estado de higiene das próteses em ótima, boa, regular e ruim. Foram avaliadas apenas as superfícies internas por estarem em contato direto com a mucosa.



Grau de higienização

- 0 sextante corado – ótima
- 1-2 sextantes corados – boa
- 3-4 sextantes corados – regular
- 5-6 sextantes corados – ruim

FIGURA 1 – Figura representativa de prótese total dividida em sextantes utilizada para avaliação da higienização.

3.2.4 Coleta micológica

As amostras para análise micológica foram coletadas pela técnica de impressão (*imprint*) por meio de discos (1,3cm de diâmetro) de papel de filtro Whatman® Grade 1 (Whatman® Laboratory Division, Maidstone, Inglaterra) previamente esterilizados em autoclave^{12,26}. Para o Grupo Teste, as amostras foram obtidas da mucosa do Palato (P-região central), face interna da Prótese Total superior (PT-região central) e dorso de Língua (L), pressionando-se o papel de filtro por 20 segundos em cada região. Para o Grupo Controle, as amostras foram coletadas pela mesma

metodologia, da mucosa do palato (região central) e dorso de língua. Após a coleta, os discos de papel foram colocados diretamente nas placas de cultura com a face de contato da mucosa palatina, prótese total ou dorso da língua voltada para o meio de cultura. Todas as amostras foram coletadas por um único examinador, no período da manhã, para minimizar variações na microbiota bucal.

3.3 Procedimentos laboratoriais

3.3.1 Isolamento de *Candida*

Após a coleta com o disco de papel de filtro colocado diretamente em placa de Petri de polietireno (60x15mm) contendo meio de cultura seletivo, CHROMagar Candida (CHROMagar™, Paris, França), as amostras micológicas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Este meio de cultura pré-identifica três espécies de *Candida*, de acordo com a coloração apresentada pela colônia, sendo a cor verde para *C. albicans*, a cor azul acinzentado para *C. tropicalis*, a cor rosa para *C. krusei* e as cores variando entre o branco e rosa para as outras espécies (Figuras 2 e 3).

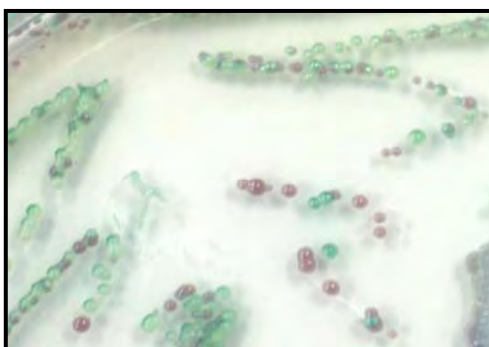


FIGURA 2 – Cultura em CHROMagar Candida após 48 horas (verde para *C. albicans* e rosa para outra espécie não identificada pelo meio seletivo).

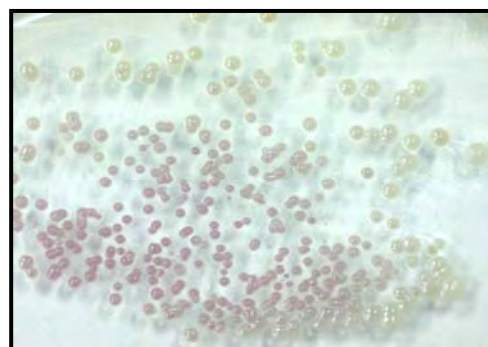


FIGURA 3 – Cultura em CHROMagar Candida após 48 horas (rosa e branco: espécies não identificadas pelo meio seletivo).

3.3.2 Identificação das espécies de *Candida*

Das placas com cultura positiva, foram selecionadas colônias representativas, para identificação da espécie presente, sendo semeada em tubo de ensaio contendo ágar Sabouraud (DIFCO e MERCK) acrescido de cloranfenicol. Quando da presença de colorações diferentes na placa, foram semeadas em tubos diferentes. A identificação foi realizada de acordo com Kurtzman e Fell⁶² (1998), utilizando-se as provas de filamentação e produção de clamidoconídio (características micromorfológicas), fermentação e assimilação de carboidratos por meio do API 20C AUX (propriedades bioquímicas). As leveduras identificadas como *C. albicans* foram submetidas às provas de crescimento à 45°C e assimilação de xilose e α -metil-D-glucosídeo avaliadas pelo API 20C AUX (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para diferenciá-las de *C. dubliniensis*⁴¹.

Nos casos em que houve contaminação das amostras, as mesmas foram semeadas em tubos contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol até estarem livres da contaminação, com exceção de quatro amostras de quatro indivíduos que não foram possíveis de serem recuperadas.

A micoteca originada deste estudo está sendo mantida no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

3.3.3 Extração de DNA

A escolha de kits comerciais, tanto para a extração de DNA genômico quanto para a análise genética, visou à praticidade do processo e melhor padronização da amostra.

A extração de DNA genômico foi realizada por meio do kit comercial, Puregene™ DNA Purification System D-6000A (Gentra Systems INC., Minneapolis, Minn., EUA).

Iniciou-se com a semeadura dos isolados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol pela técnica de esgotamento. Após 48 horas, uma colônia isolada foi semeada em 5mL de meio líquido YPD (1% de extrato de levedura, 1% de dextrose e 2% de peptona), incubados a 37°C sob agitação de 30Hz (ou 150rpm), *overnight*. Em seguida 1mL do meio semeado foi transferido para um microtubo e a partir daí foi seguido o protocolo de extração fornecido pelo kit Puregene™ DNA Purification System.

A concentração e pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 260nm e 280nm, para calcular a quantidade de DNA a ser utilizada nas reações de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Foram obtidos resultados similares e dentro dos padrões requisitados pelo kit de RAPD (5-50ng), permitindo padronizar a quantidade de DNA em volume (3µL) e não em concentração.

3.3.4 Análise Genética

A tipagem molecular dos isolados encontrados foi realizada pelo método de RAPD^{35,64} utilizando dois iniciadores aleatórios do kit comercial Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA) e dois do kit comercial Operon (Operon Technologies, Cologne, Alemanha).

Para a escolha dos dois iniciadores do kit Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads a serem utilizados, foram avaliados, em estudo piloto, os seis iniciadores provenientes do próprio kit, denominados por números, sendo eles: 1 – (5'-d[GGTGCGGGAA]-3')

2 – (5'-d[GTTTCGCTCC]-3')

3 – (5'-d[GTAGACCCGT]-3')

4 – (5'-d[AAGAGCCCGT]-3')

5 – (5'-d[AACGCGCAAC]-3')

6 – (5'-d[CCCGTCAGCA]-3')

Após as reações, foram escolhidos os iniciadores 4 e 6 (Figuras 4 e 5), de acordo com avaliação prévia de três pesquisadores do Laboratório de Micologia com experiência nesta metodologia.

O kit Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads contém além dos iniciadores, 100 microtubos com *beads* (mistura liofilizada). Para o volume final de 25µL da reação os *beads* contém AmpliTaq™ DNA polimerase, fragmento *Stoffel*, dNTPs (0,4mM cada dNTP), BSA (2,5µg) e tampão (3mM MgCl₂, 30mM KCl e 10mM Tris, pH 8,3). Para a reação são

necessários 25pmol do iniciador, 5-50ng de DNA e água destilada para completar um volume de 25µL. Nossas reações foram realizadas com 5µL do iniciador (4 ou 6), 3µL de DNA e 17µL de água destilada estéril, totalizando os 25µL recomendados. Em seguida as amostras foram levadas ao termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700, Norwalk, CT, EUA), para amplificação, utilizando um ciclo inicial de temperatura de desnaturação de 95°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 3 tempos, sendo 95°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

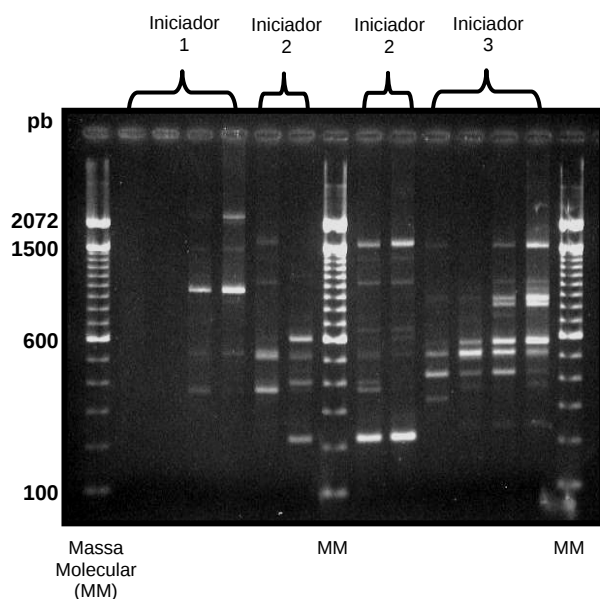


FIGURA 4 – Padronização das amostras com os iniciadores 1, 2 e 3 (kit Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences), em gel de agarose 2%, após 2 horas, à 150 volts.

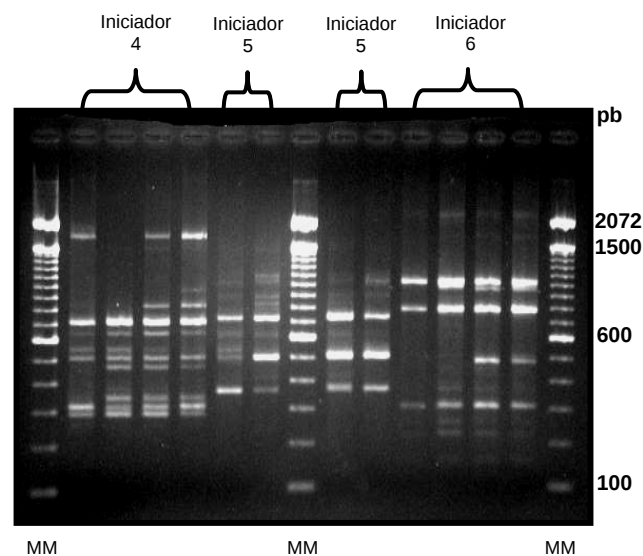


FIGURA 5 – Padronização das amostras com os iniciadores 4, 5 e 6 (kit Ready-To-Go/RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences), em gel de agarose 2%, após 2 horas, à 150 volts.

Os iniciadores do kit Operon foram escolhidos baseados em estudos prévios⁴⁶⁻⁴⁹, sendo utilizados os iniciadores OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3') e OPE-03 (5'-CCAGATGCAC-3'). Foi utilizada a

mesma metodologia descrita para os iniciadores da Amersham Biosciences. O padrão de amplificação pode ser visto na Figura 6.

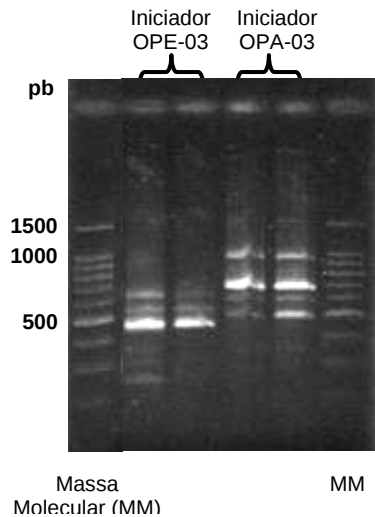


FIGURA 6 – Padrão de amplificação dos iniciadores OPE-03 e OPA-03 (Operon Technologies), em gel de agarose 2%, após 2 horas, a 150 volts.

Após a amplificação das amostras, os produtos da amplificação (ou amplicons) foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (Tris 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2mM, pH 8,0) durante 2 horas a 150volts. Os produtos de amplificação no gel, foram corados por brometo de etídio, na concentração de 0,05µL/mL e visualizados à luz ultra-violeta.

Em todos os géis foi utilizado um padrão de DNA com massa de 100pb (Promega), para orientação na identificação do tamanho dos fragmentos obtidos. A imagem dos géis foi obtida pelo aparelho ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA).

A análise dos resultados obtidos por RAPD foi feita no programa GelCompar (Applied Maths, Version 2.0, Bélgica), utilizando os

coeficientes de similaridade Dice e agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic averages*), para gerar os dendrogramas, considerando otimização de 2% e tolerância de 3%. Os valores 1,0 no coeficiente de similaridade e 100% no dendrograma representam amostras geneticamente idênticas, valores 0,80-0,99 ou 80-99% representam isolados altamente relacionados, e valores abaixo de 0,8 ou de 80% representam isolados não relacionados²².

3.3.5 *Preparação dos corpos-de-prova de acrílico para adesão da Candida spp..*

Os corpos de prova foram confeccionados com base em metodologia de Samaranayake e MacFarlane⁹⁹ (1980), modificado, sendo confeccionados em resina termopolimerizável QC 20 (DeguDent, Dentsply, Rio de Janeiro, Brasil). Iniciou-se pela inclusão de uma lâmina de cera 7 em mufla. Essa lâmina de cera foi demarcada com linhas transversais e horizontais delimitando quadrados de tamanho de 5x5mm. O preparo e prensagem da resina foram feitos de acordo com o fabricante, ou seja, 23 gramas de pó para cada 10mL de líquido. Após eliminação da cera, a resina na fase plástica foi condensada no interior da mufla, e prensada utilizando o ciclo A de polimerização como segue: imersão da mufla em água em ebulição, mantendo o aquecimento por mais 20 minutos após nova ebulição. Após o ciclo de polimerização, a mufla foi resfriada em temperatura ambiente por 10 minutos e imersa em água corrente. Em seguida a mufla foi aberta, a placa de acrílico formada

e demarcada desincluída para limpeza com água e sabão neutro para remoção do gesso e posterior recorte dos corpos de prova. Não foi realizado polimento desta placa, a fim de se imitar a superfície interna da prótese total. Os corpos de prova foram colocados em água destilada por uma semana para remover o excesso de monômero. Após esse período, foram lavados em água corrente por três horas e secos em meio ambiente. Posteriormente, os corpos de prova foram esterilizados em óxido de etileno.

A escolha dos isolados foi baseada nos dendrogramas gerados. Foram consideradas apenas as espécies mais prevalentes. Para tanto, foram selecionados isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Em cada sistema (Amersham Biosciences e Operon Technologies) foi escolhido o iniciador que apresentou os isolados de forma mais relacionada.

Após esta seleção, foi realizada nova semeadura dos isolados, em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol. Após 24 horas, duas alçadas carregadas foram semeadas em 5mL de meio líquido HAM F12 (mistura nutritiva), incubados a 37°C, *overnight*. Após esse período foi preparada uma suspensão de células das leveduras em solução fisiológica 0,85% (10^8 células/mL) e quantificadas em câmara de Neubauer.

Os corpos de prova foram colocados verticalmente nos orifícios (5mm de diâmetro) de uma placa de microtitulação, em triplicata para cada isolado selecionado. 0,3mL dessa suspensão com 10^8 células/mL

foram colocadas em cada orifício da placa até cobrir todo o corpo de prova. A placa foi acondicionada em incubadora à 37°C por 3 horas. Em seguida, essa solução foi aspirada, os corpos de prova lavados uma vez com água destilada estéril e secos em incubadora à 37°C por 30 minutos. Após esse período, os corpos de prova foram corados pela coloração de Giemsa e novamente secos em incubadora a 37°C, *overnight*. A seguir, os corpos de prova foram colocados em lâmina de vidro e as células quantificadas por contagem direta de 16 campos determinados aleatoriamente em microscopia óptica (magnificação de 400x), por dois examinadores experientes e cegos ao tipo de isolado. O controle negativo (Figura 7) foi obtido com três corpos de prova corados sem realização da metodologia de adesão e o controle positivo (Figura 8) com três corpos de prova corados após a metodologia de adesão em solução concentrada de células (meio líquido).

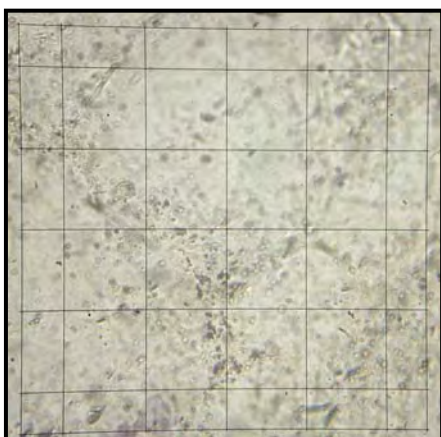


FIGURA 7 – Observação em microscopia óptica (magnificação 400x) do corpo de prova de resina termopolimerizável – controle negativo.

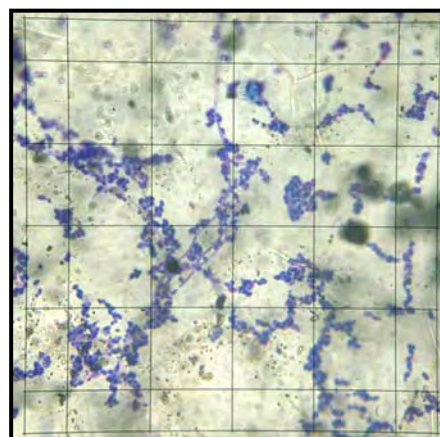


FIGURA 8 – Observação em microscopia óptica (magnificação 400x) do corpo de prova de resina termopolimerizável – controle positivo.

3.3.6 Identificação do grupo sanguíneo

Foi coletada amostra de sangue venoso dos indivíduos para verificação do tipo sanguíneo (sistemas ABO, RH e Lewis) de acordo com rotina do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

- Sistemas ABO e RH:

Para os antígenos ABO foram realizadas a tipagem direta e a tipagem reversa dos antígenos. Para o RhD foi executada a prova direta em paralelo com o controle.

A tipagem direta dos antígenos ABO e RhD foi executada em microplaca contendo soros específicos anti-A, anti-B, anti-A,B, anti-D e controle Rh (ASEM), sobre os quais foram dispensadas as soluções de hemácias dos indivíduos, diluídas em solução fisiológica 0,85%.

A tipagem reversa para os antígenos ABO também foi executada em microplaca contendo hemácias conhecidas A₁ e B (*reverse*) (ASEM) sobre as quais foram dispensadas as amostras de plasma dos indivíduos. As microplacas foram centrifugadas a 1500rpm por um minuto (HERMLE Z380). A leitura dos testes foi feita após o estágio de centrifugação, no qual ocorre a aglutinação nos orifícios das microplacas. Quando ocorre reação antígeno-anticorpo, as hemácias são aglutinadas, indicando positividade. O padrão para leitura pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1 – Padrão para leitura da tipagem direta e reversa dos antígenos

ABO

DIRETA			REVERSA		RESULTADO FINAL
anti-A	Anti-B	anti-A,B	A1	B	
+	-	+	-	+	A
-	+	+	+	-	B
+	+	+	-	-	A, B
-	-	-	+	+	O

- Sistema Lewis:

As tipagens dos antígenos eritrocitários Le^a e Le^b foram executadas pela microtécnica de gel centrifugação (ID Micro Typing System, DiaMed, Suíça).

Procedeu-se o tratamento enzimático das hemácias dos indivíduos com Bromelina por 10 minutos a temperatura ambiente. Então, foi dispensada em cartão gel Sephadex G100 contendo anti-soro anti-Lewis e centrifugado a 1000rpm por dez minutos. O microtubo contido no cartão, onde se encontra o gel, é cônico. Dessa forma, durante a centrifugação, as hemácias que não aglutinarem atravessam o gel e formam um botão no fundo, indicando que o teste é negativo. As hemácias aglutinadas pelos anticorpos ficam retidas no gel demonstrando que o teste é positivo (Figura 9).

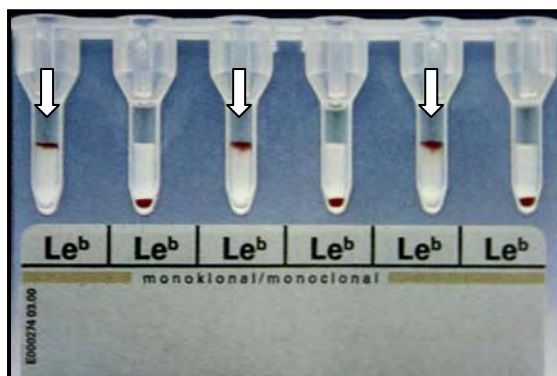


FIGURA 9 – Observação da reação positiva de tipagem sangüínea para o antígeno Le^b (setas).

3.4 Análise Estatística

Os dados clínicos, micológicos, moleculares, tipagem dos grupos sangüíneos e adesão foram tabulados e expressos segundo sua prevalência e analisados estatisticamente por métodos não-paramétricos. Diferenças entre grupos foram analisadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney para as variáveis numéricas e Qui-quadrado para as variáveis categóricas. As variáveis clínicas e micológicas foram correlacionadas por meio do teste de Spearman e Pearson e avaliadas por métodos de regressão logística multivariada. Significância estatística foi estabelecida em nível de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADO

4 RESULTADO

4.1 Anamnese e história odontológica

Foram avaliados 78 indivíduos, média de idade de $58,38 \pm 12,87$ anos, divididos em dois grupos: teste e controle. Os dados obtidos na anamnese, como o relato da presença de doenças sistêmicas, uso de medicamentos, hábito de fumar e queixa de sintomatologia relacionada à EP estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Média $\pm$ desvio padrão (percentual dentro da amostra) das variáveis avaliadas para os grupos teste e controle

	GRUPO TESTE	GRUPO CONTROLE
<i>n</i> (indivíduos)	60	18
Idade (anos)	$62,48 \pm 11,34$	$44,72 \pm 6,91$
Gênero (m:f)	13:47	6:12
Doença sistêmica	44 (73,3%)	10 (55,6%)
Uso de medicamento	42 (70%)	9 (50%)
Fumante	13 (21,7%)	0 (0%)
Sintomatologia*	21(35%)	2 (11,1%)

* Para o Grupo Teste foi avaliada sintomatologia relacionada à EP e para o Grupo Controle, sintomatologia relacionada à infecção por *Candida* spp..

A doença sistêmica mais relatada nos dois grupos foi a hipertensão arterial e a medicação mais utilizada, os anti-hipertensivos.

A sintomatologia relacionada à EP mais relatada foi a de boca seca, nos dois grupos avaliados, embora alguns indivíduos do grupo teste tenham relatado outros sintomas como ardência, queimação e prurido, sempre associados ao de boca seca.

Na história odontológica, os resultados obtidos quanto aos hábitos de higiene da cavidade bucal e com a PT estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Hábitos de higiene em relação à cavidade bucal e à prótese total (PT) para os grupos teste e controle

Hábitos de Higiene	Grupo Teste	Grupo Controle
Limpeza da PT	60 (100%)	-----
Embebição da PT	26 (43,3%)	-----
Limpeza da mucosa	26 (43,3%)	-----
Bochecho	60 (100%)*	-----
Limpeza da língua	34 (56,7%)	14 (77,8%)
Escovação (3x/dia)	-----	11 (61,1%)

* Foi considerado qualquer tipo de bochecho/ enxaguatório.

A maioria dos indivíduos que realizava embebição da prótese total utilizava uma mistura de água e hipoclorito de sódio.

No grupo teste, a experiência dos indivíduos com o uso de prótese total indicou média de $28,78 \pm 11,53$ anos, e a média de idade das próteses atuais foi de $20,06 \pm 11,94$ anos. A frequência de uso da prótese total superior foi de 73,3% (44) para uso contínuo, 25% (15) para uso diurno e 1,7% (1) para uso esporádico. Analisando o grau de satisfação com a prótese, 53 indivíduos (83,3%) consideravam-se satisfeitos com suas próteses totais, embora 20 indivíduos desse grupo tenham relatado desconforto pela presença de áreas dolorosas ou falta de retenção. Os sete indivíduos que relataram falta de satisfação com a prótese total apresentaram os mesmos motivos, sendo encaminhados para tratamento protético na Clínica de Prótese Total da FOAr, UNESP.

4.2 Exame clínico intra bucal

-Grupo teste: Na avaliação da mucosa do palato, 36 indivíduos (60%) do grupo teste apresentaram EP, de acordo com os parâmetros de Newton⁷⁹ (1962).

- Grupo controle: Os indivíduos do grupo controle não apresentaram sinais clínicos de infecção por *Candida* spp.. Os dados obtidos quanto às condições dentais e periodontais dos indivíduos estão apresentados na Tabela 3. O índice geral de CPOD foi de 18,1.

4.3 Avaliação das próteses totais superiores

Os resultados obtidos na análise dos indicadores que avaliaram a qualidade das PTs estão descritos na Tabela 4.

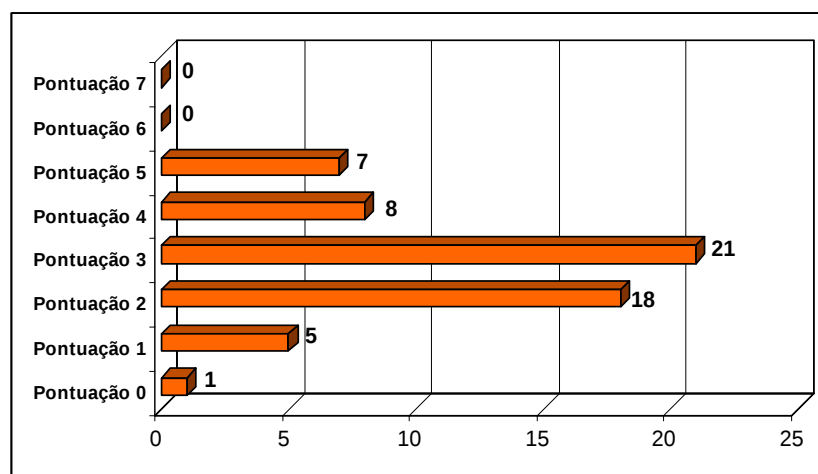
A somatória desses indicadores avaliou a qualidade das próteses totais superiores, considerando desde uma prótese totalmente adequada (pontuação zero) à uma totalmente inadequada (pontuação 7). Os resultados obtidos para esta qualificação encontram-se na Figura 10.

Tabela 3 – Média dos índices utilizados para avaliação dos indivíduos do grupo controle ($n=18$ indivíduos)

Indivíduo	CPOD	Índice	Índice	Profundidade	Sangramento	Recessão	Nível Clínico
		Placa(%)	Gengival(%)	Sondagem(mm)	Sondagem(%)	Gengival(mm)	Inserção(mm)
01	13	38,8	2,8	1,8	19,5	0,3	2,1
02	20	75	2,8	2,1	44,4	0,5	2,6
03	23	66,7	0	1,5	30,6	0,1	1,6
04	24	50	0	2,4	36,1	0,5	2,9
05	14	58,3	0	2,3	50	0	2,3
06	22	47,2	2,8	2,1	38,9	0,2	2,3
07	21	8,3	0	1,9	25	0,9	2,8
08	17	33,3	5,6	1,7	38,9	0,03	1,7
09	14	66,7	2,7	2,9	36,1	0	2,9
10	18	83,3	16,7	2,4	36,1	0,03	2,4
11	17	91,7	0	4,1	50	0,5	4,6
12	11	11,1	0	1,9	13,9	0	1,9
13	13	25	0	2,1	5,6	0,3	2,4
14	22	8,3	0	1,6	2,8	0,3	1,9
15	18	66,7	8,4	2,1	41,7	0,1	2,2
16	21	0	0	2,2	30,6	1,2	3,4
17	16	50	0	1,9	5,6	0	1,9
18	21	47,2	0	2,1	41,7	0,1	2,2

Tabela 4 – Análise dos indicadores da qualidade das próteses totais (PT)

INDICADORES	CRITÉRIOS	<i>n</i>	%
DEFEITOS	Nenhum (Pontuação 0)	22	36,7%
	Pequenos (Pontuação 1)	20	33,3%
	Médios (Pontuação 2)	14	23,3%
	Grandes (Pontuação 3)	4	6,7%
MATERIAL	Satisfatório (Pontuação 0)	4	6,7%
	Insatisfatório (Pontuação 1)	56	93,3%
ESTABILIDADE	Ausência de báscula (Pontuação 0)	42	70%
	Presença de báscula (Pontuação 1)	18	30%
RETENÇÃO	Satisfatória (Pontuação 0)	58	96,7%
	Insatisfatória (Pontuação 1)	2	3,3%
OCLUSÃO	Satisfatória (Pontuação 0)	25	41,7%
	Insatisfatória (Pontuação 1)	35	58,3%

FIGURA 10 – Número de indivíduos segundo a qualidade das próteses totais superiores (*n*=60).

Na avaliação do grau de higiene das próteses totais superiores, 54 próteses (90%) foram classificadas como ruim, 2 (3,3%) como regular, 3 (5%) como boa e apenas uma (1,7%) como ótima.

4.4 Análise micológica

- Grupo teste:

Cada sítio (**P**-Palato, **PT**-Prótese Total e **L**-Língua) coletado correspondeu a uma amostra e a detecção de *Candida* spp. nestas amostras correspondeu aos isolados.

Dos 60 indivíduos avaliados, 46 (76,7%) apresentaram amostras positivas para espécies de *Candida*.

Entre o total de 180 amostras coletadas, 113 (62,8%) foram positivas para *Candida* spp., sendo 37 no palato, 35 na prótese total e 41 na língua. Entretanto, alguns indivíduos apresentaram mais de uma espécie no mesmo sítio ou mesmo variações dentro da mesma espécie, totalizando 125 isolados, sendo 40 no P, 41 na PT e 44 na L. Em quatro indivíduos, não foi possível a identificação dos isolados. Os resultados obtidos pelo API 20C AUX associados aos resultados obtidos pela prova de formação de clamidoconídio não foram determinantes para a identificação destes isolados.

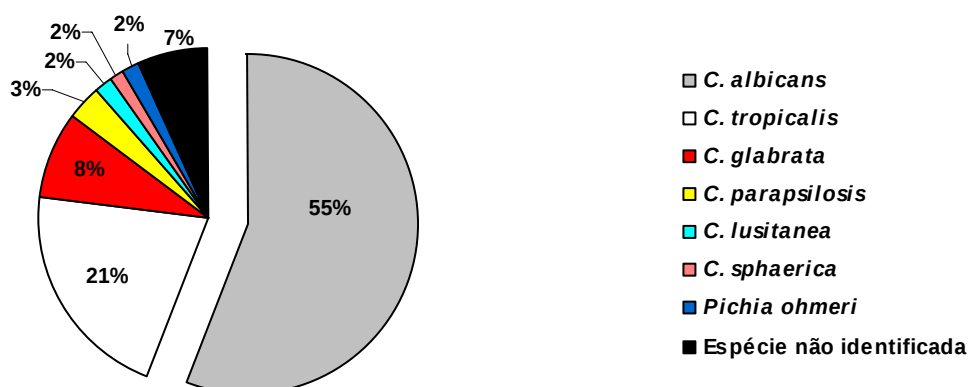


FIGURA 11 – Percentual da distribuição das espécies de *Candida* identificadas nos indivíduos do grupo teste ($n=60$ indivíduos).

A distribuição das espécies identificadas nestes indivíduos está apresentada na Figura 11 (indivíduos que apresentaram mais de uma espécie foram considerados individualmente em cada proporção). A distribuição das espécies encontradas em cada sítio de coleta está apresentada na Figura 12 (isolados da mesma espécie em um único sítio não foram considerados). Não houve diferença estatística na detecção de *Candida* spp. entre os sítios de coleta ($p=0,211$; $\chi^2=3,11$).

As espécies identificadas, suas frequências e distribuições nos sítios encontram-se na Tabela 5, considerando o total de isolados.

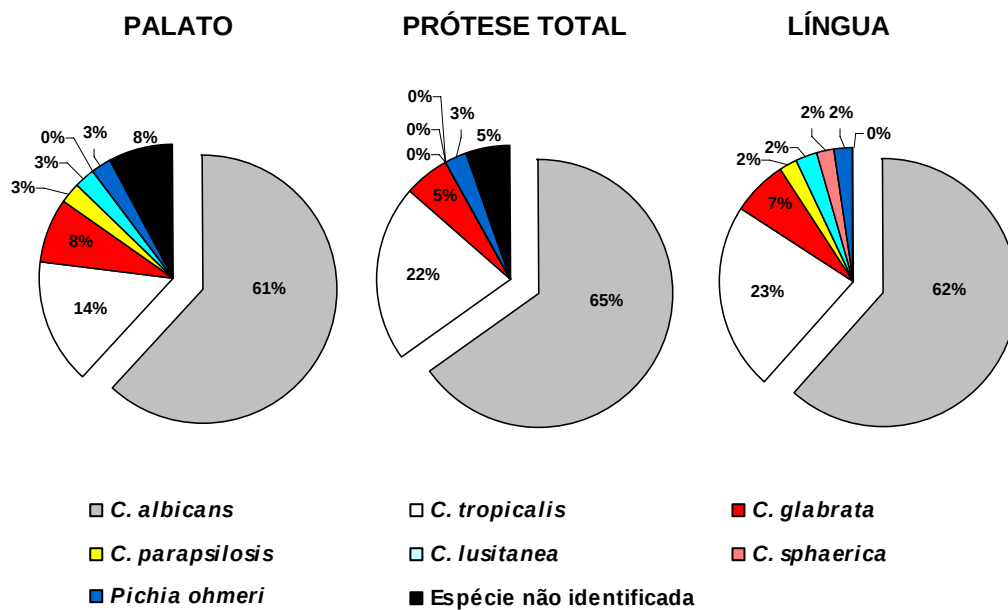


FIGURA 12 - Percentual da distribuição das espécies de *Candida* identificadas nos indivíduos do grupo teste, segundo o sítio de coleta: palato, prótese total ou língua ($n=60$ indivíduos).

Tabela 5– Identificação, distribuição e freqüência das espécies de *Candida* nos isolados obtidos nos indivíduos do grupo teste ($n=60$ indivíduos)

Sítios	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida sphaerica</i>	<i>Pichia ohmeri</i>	NI*	Total
P	25 (62,5%)	6 (15%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	0	1 (2,5%)	3 (7,5%)	40 (100%)
PT	28 (68,3%)	8 (19,5%)	2 (4,9%)	0	0	0	1 (2,4%)	2 (4,9%)	41 (100%)
L	27 (61,3%)	10 (22,7%)	3 (6,8%)	1 (2,3%)	1 (2,3%)	1 (2,3%)	1 (2,3%)	0	44 (100%)
Total	80 (64%)	24 (19,2%)	8 (6,4%)	2 (1,6%)	2 (1,6%)	1 (0,8%)	3 (2,4%)	5 (4%)	125 (100%)

* Não Identificados; P=Palato; PT=Prótese Total; L=Língua.

Os isolados de *Candida albicans* foram confirmados pela associação do API 20C AUX e prova da temperatura, não sendo obtida identificação presuntiva de *Candida dubliniensis* em nosso estudo.

Em 11 indivíduos (18,3%) foram detectadas associações entre diferentes espécies de *Candida*, sendo a associação *C.albicans* e *C. tropicalis* a mais freqüente (54,5%).

Comparando os sistemas de identificação API 20C AUX e o meio de cultura CHROMagar Candida, notamos que os sistemas foram coincidentes em 79 isolados (do total de 125, excluindo os 5 isolados não identificados). No restante, as cores observadas no meio de cultura seletiva, não coincidiram com a identificação das espécies obtidas com o API 20C AUX, e provas adicionais foram realizadas conforme sugerido pelo sistema.

O sistema API 20C AUX identifica as espécies por meio de seus fenótipos. Assim, pudemos observar a presença de fenótipos diferentes dentro de uma mesma espécie e o fenótipo mais prevalente foi o 2.576.174 (31,2%).

- Grupo controle:

As amostras deste grupo foram coletadas de dois sítios (**P**-Palato e **L**-Língua). Dos 18 indivíduos avaliados, 9 (50%) apresentaram amostras positivas para identificação de espécies de *Candida*. Do total de 36 amostras coletadas, 12 foram positivas para *Candida* spp., sendo 3 no P e 9 na L. Este grupo também apresentou indivíduos com mais de uma espécie no mesmo sítio, totalizando 14 isolados (3 no P e 11 na L).

A distribuição das espécies identificadas nestes indivíduos está apresentada na Figura 13 (indivíduos que apresentaram mais de uma espécie foram considerados individualmente em cada proporção) e a distribuição das espécies encontradas em cada sítio de coleta na Figura 14. Também não foi observada diferença estatística na detecção de *Candida* spp. entre os sítios de coleta ($p=0,077$; $\chi^2=3,12$).

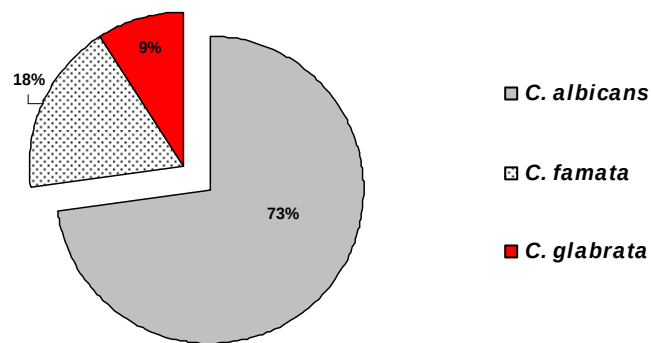


FIGURA 13 - Percentual da distribuição das espécies de *Candida* identificadas nos indivíduos do grupo controle ($n= 18$ indivíduos).

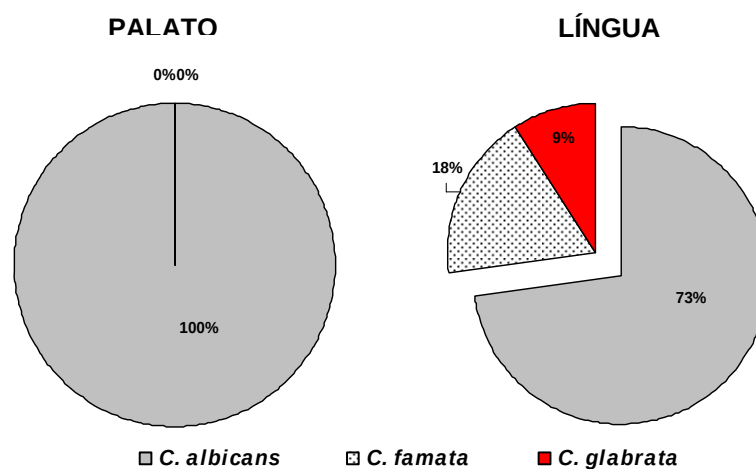


FIGURA 14 - Percentual da distribuição das espécies de *Candida* identificadas nos indivíduos do grupo controle, segundo o sítio de coleta: palato ou língua ($n= 18$ indivíduos).

As espécies identificadas, suas frequências e suas distribuições nos sítios encontram-se na Tabela 6, considerando o total de isolados.

Tabela 6 – Identificação, distribuição e frequência das espécies de *Candida* nos isolados obtidos nos indivíduos do grupo controle

Sítios	<i>C.albicans</i>	<i>C.famata</i>	<i>C.glabrata</i>	Total
P	3 (100%)	0	0	3 (100%)
L	8 (72,7%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	11 (100%)
Total	11 (78,6%)	2 (14,3%)	1 (7,1%)	14 (100%)

P=Palato; L=Língua.

Da mesma forma, os isolados de *Candida albicans* foram confirmados pela associação do API 20C AUX e prova da temperatura.

Em apenas dois indivíduos (11,1%) foram detectadas associações entre diferentes espécies de *Candida*, sendo uma entre *C. albicans* e *C. glabrata* e a outra entre *C. albicans* e *C. famata*.

Na comparação entre os sistemas de identificação API 20C AUX e CHROMagar Candida, os sistemas foram coincidentes em 12 isolados (do total de 14). O sistema API 20C AUX identificou o fenótipo 2.576.174 como o mais prevalente (78,6%).

4.5 Análise Genética

As amplificações de DNA dos isolados variaram de acordo com os iniciadores utilizados. Dessa forma, os isolados que não amplificaram ou, na análise do gel, não apresentaram bom padrão de amplificação, não constam dos dendrogramas dos respectivos iniciadores. A metodologia foi repetida três vezes, para esses isolados, todas com resultados negativos.

Optamos por analisar somente os dendrogramas referentes às espécies mais prevalentes neste estudo (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*). Os isolados foram analisados por meio dos perfis genotípicos obtidos a partir da presença ou ausência de bandas, avaliando o nível de similaridade entre as cepas e entre os kits utilizados.

- ***Candida albicans***: dos 91 isolados foram genotipados 79. Houve variação na quantidade de amplificações de acordo com o iniciador utilizado, sendo 65 isolados amplificados com o iniciador 4, 70 isolados

com o iniciador 6, 78 isolados com o iniciador OPA-03 e 74 isolados com o iniciador OPE-03. Onze isolados não amplificaram em nenhum dos quatro iniciadores utilizados e um isolado foi perdido por contaminação.

- ***Candida tropicalis***: dos 24 isolados foram genotipados 21. Também apresentou variação na quantidade de amplificações de acordo com o iniciador utilizado, sendo 17 isolados amplificados com o iniciador 4 e com o iniciador 6, e 21 isolados com o iniciador OPA-03 e com o iniciador OPE-03. Da mesma forma, alguns isolados (3) não amplificaram em nenhum dos 4 iniciadores.

- ***Candida glabrata***: dos 9 isolados obtidos foram genotipados 8, pois um isolado foi descartado por contaminação. Foram amplificados sete isolados com o iniciador 4 e com o iniciador 6, e oito com o iniciador OPA-03 e com o iniciador OPE-03.

ANÁLISE DOS DENDROGRAMAS:

- ***C. albicans***

Todos os dendrogramas foram gerados com a cepa ATCC 64550, e com todos os iniciadores ela gerou um perfil genotípico diferente de todos os outros isolados. Os isolados sublinhados nos dendrogramas referem-se aos indivíduos com diagnóstico de EP.

- INICIADOR 4 (65 isolados + cepa ATCC): gerou 31 perfis genotípicos e possui 17 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 15. Os isolados foram classificados em 4 grupos, sendo que a maioria dos isolados está localizada no grupo II (53

isolados). Não há similaridade entre os grupos, pois o coeficiente de similaridade entre os grupos I e II é em torno de 0,65, em torno de 0,5 entre o grupo III e os dois anteriores e abaixo de 0,45 entre o grupo IV e o grupo III.

O grupo II se divide em dois subgrupos (1 e 2) que não se relacionam (coeficiente de similaridade em torno de 0,7). O subgrupo 2 é composto por 2 isolados, relacionados em torno de 0,8. O subgrupo 1 também se divide em mais dois subgrupos (1a e 1b). O subgrupo 1a possui oito clusters, sendo que quatro clusters contêm 3 isolados cada um e outros dois clusters contêm 2 isolados cada. Nos dois clusters restantes, um é formado por 4 isolados e outro por 5. Entretanto, ele também se subdivide e podemos notar mais três subgrupos distintos (1a.a'(1), 1a.a'(2) e 1a.a''). No primeiro (1a.a'(1)) e no terceiro (1a.a''), os isolados se relacionam em torno de 0,85, enquanto os isolados do segundo (1a.a'(2)) são altamente relacionados (coeficiente de similaridade em torno de 0,9). Esses três subgrupos (1a.a'(1), 1a.a'(2) e 1a.a'') se apresentam moderadamente relacionados, com coeficiente de similaridade em torno de 0,8.

O subgrupo 1b possui cinco clusters, dois clusters com 5 isolados cada um, um cluster com 4 isolados e outros dois clusters com 2 isolados cada. Este subgrupo 1b também apresenta subdivisão, com mais três subgrupos distintos (1b.b', 1b.b''(1) e 1b.b''(2)). No primeiro (1b.b'), cinco isolados são clones (pertencentes ao grupo controle), um outro isolado

(também do grupo controle) é altamente relacionado com este cluster e um outro isolado (cepa ATCC) se relaciona moderadamente com os anteriores (em torno de 0,85). No segundo (1b.b''(1)), 2 isolados são clones e 1 se relaciona com este cluster em torno de 0,85. No terceiro (1b.b''(2)), são dois clusters altamente relacionados (0,95) e um terceiro cluster que se relaciona com os dois anteriores em torno de 0,9. Os três subgrupos (1b.b', 1b.b''(1) e 1b.b''(2)) se relacionam em torno de 0,85.

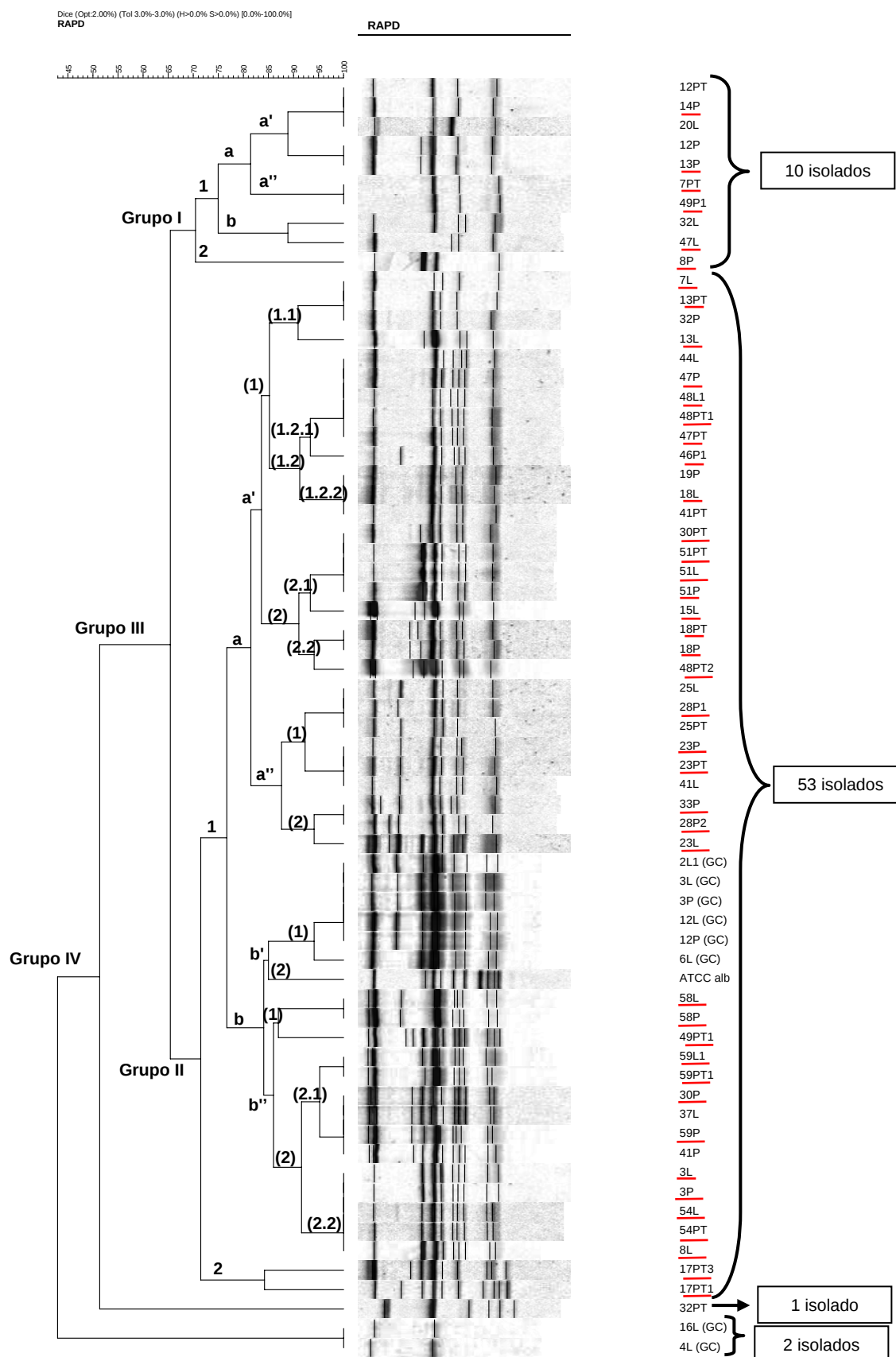


FIGURA 15 - Dendrograma dos isolados de *C. albicans* obtidos com o iniciador 4 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR 6 (70 isolados + cepa ATCC): gerou 26 perfis genotípicos e possui 12 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 16. Os isolados foram classificados em cinco grupos. Dois grupos (I e II) contêm a maioria dos isolados (32 isolados e 26 isolados, respectivamente). Não há similaridade entre os grupos, sendo que o coeficiente de similaridade entre os grupos I e II é em torno de 0,7, em torno de 0,55 entre o grupo III e os dois anteriores, em torno de 0,50 entre o grupo IV e o grupo III e abaixo de 0,4 entre os grupos IV e V.

O grupo I se divide em dois subgrupos (1 e 2) não relacionados (coeficiente de similaridade em torno de 0,7). O subgrupo 2 é formado por dois isolados clones. O subgrupo 1 ainda se subdivide em mais três subgrupos distintos (1a', 1a'' e 1b). O primeiro (1a') é formado por 13 isolados clones e um outro isolado que é moderadamente relacionado com este cluster (em torno de 0,85). O segundo (1a'') é formado por 5 isolados clones e um outro isolado que se relaciona com este cluster em torno de 0,9. O terceiro (1b) é formado por dois clusters altamente relacionados (em torno de 0,9), sendo que um agrupa 3 isolados e o outro, 7 isolados.

O grupo II também se divide em dois subgrupos (1 e 2) não relacionados (coeficiente de similaridade em torno de 0,75). Estes subgrupos também apresentam subdivisões. O subgrupo 1 apresenta quatro subdivisões (1a.a'(1), 1a.a'(2), 1a.a'' e 1b). O primeiro (1a.a'(1)) é formado por 8 isolados clones e mais um isolado altamente relacionado

com este cluster (0,9). O segundo (1a.a'(2)) é formado por 8 isolados clones e se relaciona com o anterior em torno de 0,85. O terceiro (1a.a'') é formado por 2 isolados que se relacionam entre si em torno de 0,9 e com os subgrupos 1a.a'(1) e 1a.a'(2) em torno de 0,8. O quarto subgrupo (1b) é formado por 1 isolado que se não se relaciona com os subgrupos (em torno de 0,75).

O subgrupo 2 apresenta duas subdivisões (2a e 2b), moderadamente relacionadas (em torno de 0,85). O subgrupo 2b é formado por 2 isolados clones, enquanto o subgrupo 2a é formado por 3 isolados clones e um outro isolado altamente relacionado com este cluster (em torno de 0,9).

Neste dendrograma o grupo III agrupou todos os isolados amplificados do grupo controle (6), sendo divididos em três clusters com 2 isolados clones cada. Dois clusters são altamente relacionados (em torno de 0,95) e se relacionam com o terceiro cluster em torno de 0,8.

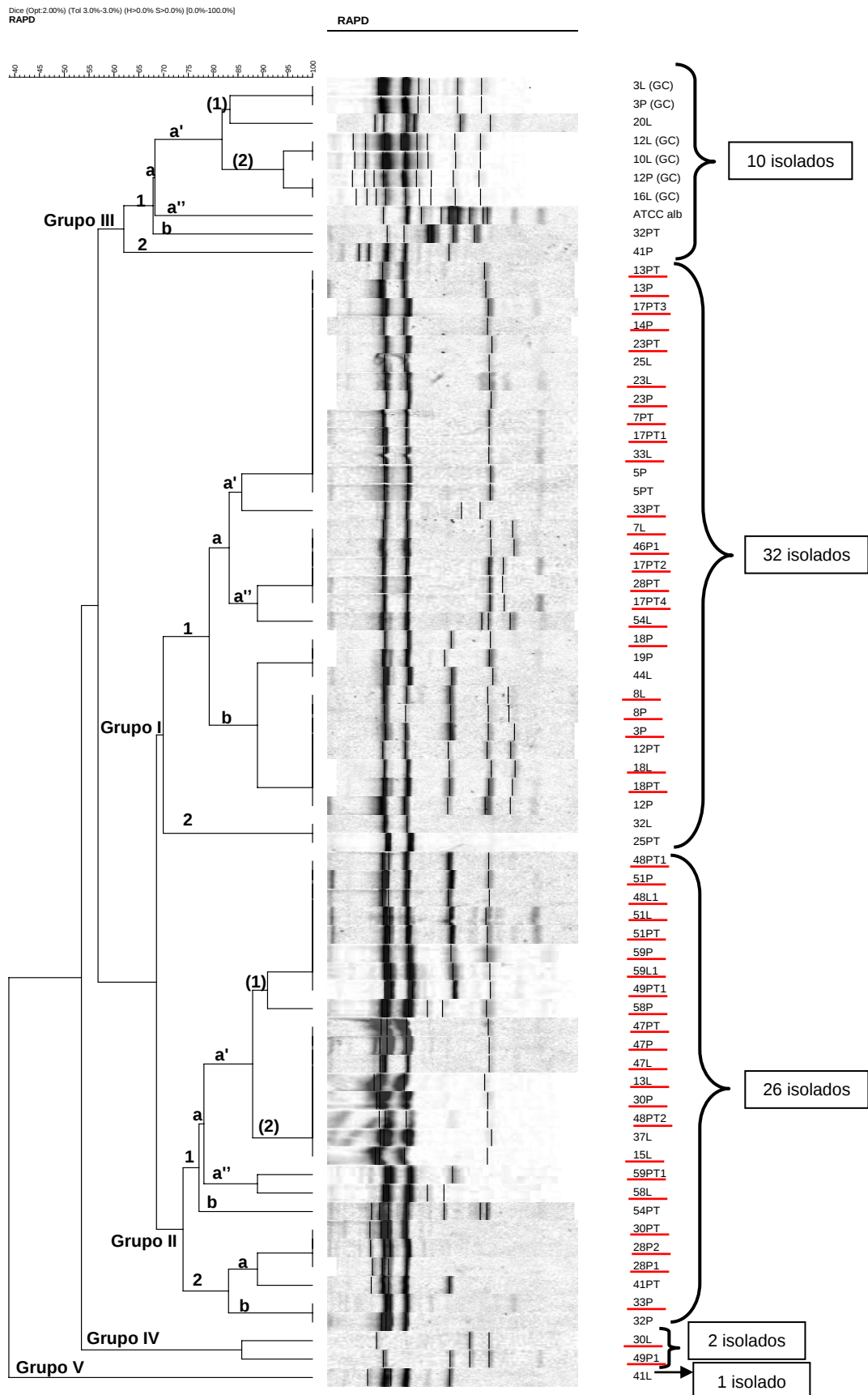


FIGURA 16 - Dendrograma dos isolados de *C. albicans* obtidos com o iniciador 6 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR OPA-03 (78 isolados + cepa ATCC): gerou 31 perfis genotípicos e 18 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 17. Os isolados foram classificados em 6 grupos, sendo que o grupo II agrupou a maioria dos isolados (52). Os 6 grupos não se relacionam, pois o coeficiente de similaridade entre os grupos I e II é em torno de 0,75 e em torno de 0,7 entre eles e com o grupo III. Os demais grupos apresentam-se com coeficiente de similaridade abaixo de 0,6 em relação aos grupos anteriores.

O grupo II se divide em outros dois subgrupos (1 e 2), moderadamente relacionados (coeficiente de similaridade em torno de 0,8). Estes por sua vez também apresentam subdivisões. O subgrupo 2 apresenta duas subdivisões (2a e 2b), relacionadas em torno de 0,85. O 2a é formado por dois clusters altamente relacionados (0,9), sendo que um agrupa quatro isolados clones e o outro, dois isolados clones, enquanto o 2b é formado por 2 isolados clones.

O subgrupo 1 também apresenta duas subdivisões (1a e 1b), relacionadas em torno de 0,8. O 1b é formado por dois clusters altamente relacionados (0,9), sendo um com 6 isolados clones e o outro com 3 isolados clones. O 1a apresenta-se ainda com várias outras subdivisões, podendo ser distinguidos outros cinco subgrupos (1a'(1.1.1), 1a'(1.1.2), 1a'(1.2), 1a' (2) e 1a''). O 1a'(1.1.1) é formado por dois clusters altamente relacionados (em torno de 0,95), sendo que um agrupa dois isolados clones e o outro, onze isolados clones. O 1a'(1.1.2) é composto por um

isolado que se relaciona com o subgrupo anterior em torno de 0,9. O 1a'(1.2) é formado por dois clusters altamente relacionados (em torno de 0,95), sendo um com seis isolados clones e outro com dois isolados clones. Este subgrupo é altamente relacionado aos anteriores (em torno de 0,9). O subgrupo 1a' (2) é formado por dois clusters altamente relacionados (0,9), sendo que um agrupa três isolados clones e o outro, quatro isolados clones, e estes dois clusters são moderadamente relacionados aos subgrupos anteriores (em torno de 0,85). A última subdivisão 1a'' agrupa a maioria dos isolados do grupo controle (6, do total de 9), sendo que cinco isolados são clones e o outro é altamente relacionado a este cluster (em torno de 0,9). Entretanto, esta subdivisão é moderadamente relacionada com as anteriores (em torno de 0,85).

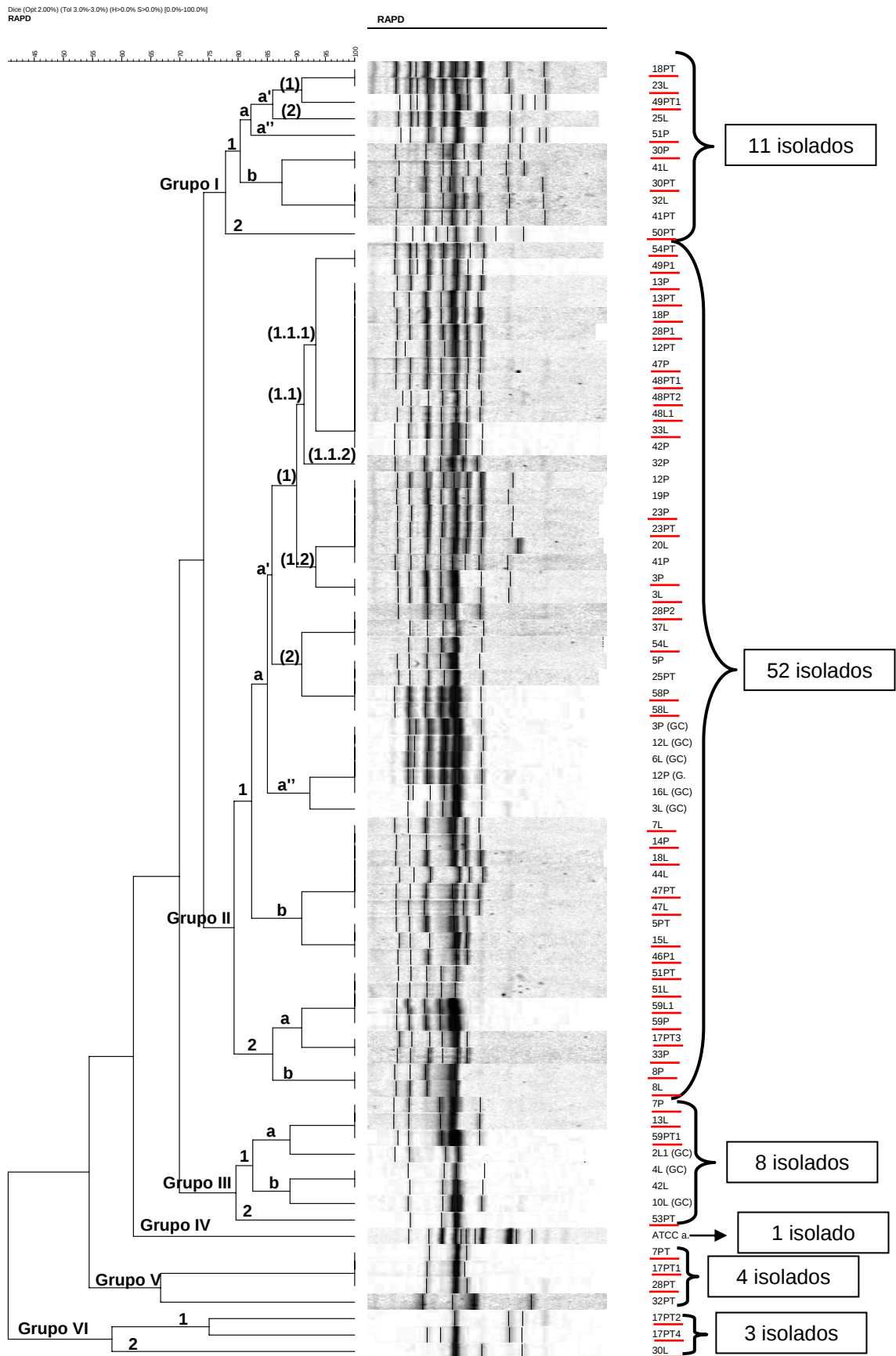


FIGURA 17 - Dendrograma dos isolados de *C. albicans* obtidos com o iniciador OPA-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR OPE-03 (74 isolados + cepa ATCC): gerou 46 perfis genotípicos e 19 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 18. Os isolados foram classificados em quatro grupos. Dois grupos (I e III) contêm a maioria dos isolados (33 e 31 isolados, respectivamente). Não há similaridade entre os grupos, sendo que o coeficiente de similaridade entre os grupos I e II é em torno de 0,75, entre esses dois grupos e o grupo III é em torno de 0,7 e abaixo de 0,65 entre os grupos III e IV.

O grupo I se divide em dois subgrupos (1 e 2) que não se relacionam (coeficiente de similaridade em torno de 0,75). Por sua vez estes subgrupos também apresentam subdivisões. O subgrupo 1 se subdivide ainda em 1a e 1b. O 1a é formado por dois clusters moderadamente relacionados (em torno de 0,8), sendo que um cluster agrupa dois isolados clones e o outro agrupa quatro isolados clones. O 1b é formado por um isolado que não se relaciona com o 1a (coeficiente abaixo de 0,8).

O subgrupo 2 também se subdivide em 2a e 2b, sendo moderadamente relacionados. O 2a apresenta seis subgrupos distintos (2a.a'(1.1.1), 2a.a'(1.1.2), 2a.a'(1.2), 2a.a'(2.1), 2a.a'(2.2) e 2a''). O 2a.a'(1.1.1) é formado por um cluster com três isolados clones e um outro isolado altamente relacionado com este cluster (em torno de 0,95). O 2a.a'(1.1.2) é formado por um isolado altamente relacionado com o 2a.a'(1.1.1). O 2a.a'(1.2) também apresenta um isolado altamente

relacionado com o subgrupo anterior (em torno de 0,9). O 2a.a'(2.1) é formado por um cluster com três isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a estes. O 2a.a'(2.2) é formado por dois clusters contendo dois isolados clones cada um, e são altamente relacionados com o 2a.a'(2.1). Por sua vez estes se relacionam com os subgrupos 2a.a'(1.1) e 2a.a'(1.2) em torno de 0,85. O subgrupo 2a'' é formado por dois isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a estes, e por sua vez são moderadamente relacionados aos subgrupos a' (coeficiente de similaridade em torno de 0,85).

O 2b apresenta quatro subgrupos distintos (2b.b'(1), 2b.b'(2), 2b.b''(1) e 2b.b''(2)). O 2b.b'(1) é formado por dois isolados altamente relacionados (0,9), que por sua vez se relacionam moderadamente com o isolado que compõe o 2b.b'(2). O 2b.b''(1) possui quatro isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a eles. Esses cinco isolados também são altamente relacionados ao isolado do 2b.b''(2), com coeficiente de similaridade em torno de 0,9.

O grupo III também se divide em dois grupos (1 e 2), não relacionados. O subgrupo 2 é formado apenas por 1 isolado (cepa ATCC). O subgrupo 1 apresenta-se subdividido em 1a e 1b, também não relacionados entre si (coeficiente de similaridade abaixo de 0,8). O 1a apresenta oito subgrupos distintos (1a.a'(1.1.1), 1a.a'(1.1.2), 1a.a'(1.2.1), 1a.a'(1.2.2), 1a.a'(2.1.1), 1a.a'(2.1.2), 1a.a'(2.2) e 1a''). O 1a.a'(1.1.1) é formado por dois isolados clones e por um outro isolado altamente

relacionado a estes (0,95). O 1a.a'(1.1.2) é formado por apenas um isolado que se relaciona ao subgrupo anterior em torno de 0,85. O 1a.a'(1.2.1) é formado por um cluster com quatro isolados clones e um outro isolado altamente relacionado ao cluster (0,9). O 1a.a'(1.2.2) é formado por dois clusters, com dois isolados cada e se relacionam moderadamente com o 1a.a'(1.2.1). O 1a.a'(2.1.1) é formado por dois isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a estes. O 1a.a'(2.1.2) é formado por dois isolados clones e são moderadamente relacionados ao subgrupo anterior. O 1a.a'(2.2) é formado por um isolado também moderadamente relacionado com os subgrupos 1a.a'(2.1). O 1a'' é formado por dois isolados clones e não são relacionados aos subgrupos 1a'.

O 1b apresenta quatro subgrupos distintos (1b.b'(1), 1b.b'(2), 1b.b''(1) e 1b.b''(2)). O 1b.b'(1) é formado por três isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a estes. O 1b.b'(2) é formado por dois isolados clones e moderadamente relacionados ao subgrupo anterior. O 1b.b''(1) é formado por dois isolados altamente relacionados e que se relacionam com o isolado do 1b.b''(2) em torno de 0,85.

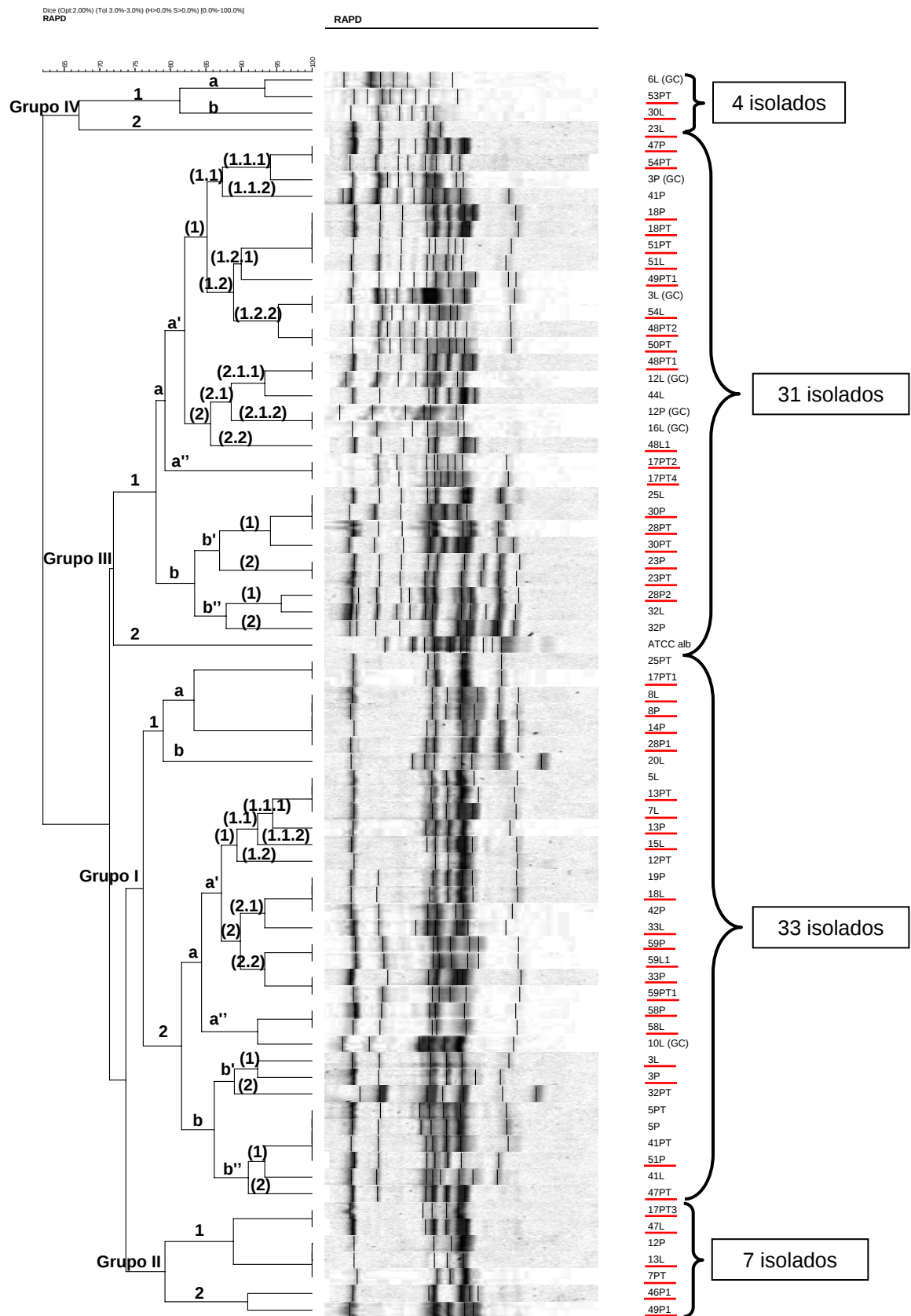


FIGURA 18 - Dendrograma dos isolados de *C. albicans* obtidos com o iniciador OPE-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- *C. tropicalis*

Todos os dendrogramas foram gerados com a cepa ATCC 750, e em todos os iniciadores ela gerou um perfil genotípico diferente de todos os outros isolados. Os isolados sublinhados nos dendrogramas referem-se aos indivíduos com diagnóstico de EP.

- INICIADOR 4 (17 isolados + cepa ATCC): gerou 13 perfis genotípicos e 4 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 19. Os isolados foram classificados em 2 grupos não relacionados entre si (coeficiente de similaridade abaixo de 0,6). O grupo II contém a maioria dos isolados (15).

O grupo II se divide em dois subgrupos (1 e 2), não relacionados entre si (coeficiente de similaridade em torno de 0,7). O subgrupo 1 apresenta ainda três subgrupos distintos (1a.a', 1a.a'' e 1b). O 1a.a' é formado por dois clusters altamente relacionados (0,9), sendo que um agrupa dois isolados clones e o outro, três isolados clones. O 1a.a'' contém apenas um isolado moderadamente relacionado com o 1a.a'. O 1b é formado por dois isolados moderadamente relacionados e que não se relacionam com o subgrupo 1a.

O subgrupo 2 também apresenta três subgrupos distintos (2a.a', 2a.a'' e 2b). O 2a.a' é formado por dois isolados altamente relacionados (0,9). O 2a.a'' contém apenas um isolado que é moderadamente relacionado ao 2a.a'. O 2b é formado por dois clusters altamente

relacionados (0,9), com dois isolados clones cada um, e que não se relacionam ao subgrupo 2a.

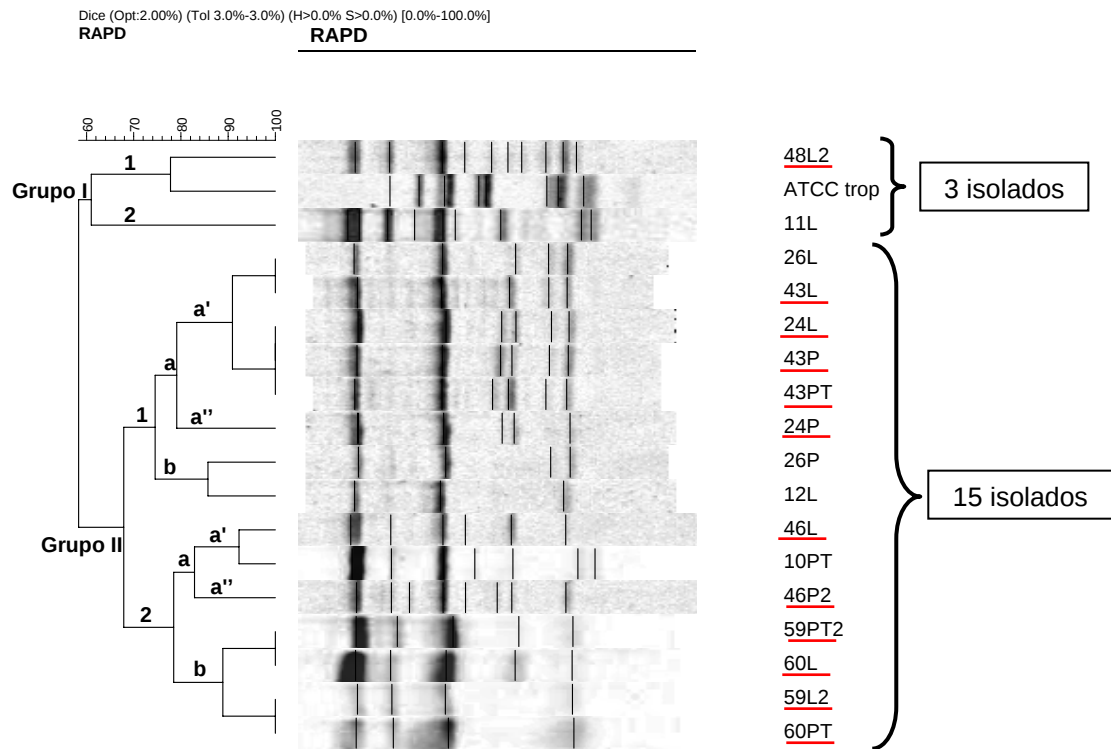


FIGURA 19 - Dendrograma dos isolados de *C. tropicalis* obtidos com o iniciador 4 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR 6 (17 isolados + cepa ATCC): gerou 13 perfis genotípicos e 4 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 20. Os isolados foram classificados em 4 grupos e o grupo I foi o que agrupou mais isolados (11). Os 4 grupos não se relacionam, apesar do coeficiente de similaridade entre os grupo I e II ser próximo de 0,8. O coeficiente de similaridade entre o grupo III e os grupos I e II é em torno de 0,7 e em torno de 0,65 entre os grupos III e IV.

O grupo I se divide em dois subgrupos (1 e 2) não relacionados. O subgrupo 1 apresenta outros três subgrupos (1a.a', 1a.a'' e 1b). O 1a.a' é formado por dois isolados altamente relacionados e que são moderadamente relacionados com o isolado do 1a.a''. O 1b também apresenta um isolado moderadamente relacionado com os subgrupos 1a.

O subgrupo 2 apresenta outros dois subgrupos (2a e 2b). O 2a contém dois isolados altamente relacionados e que também são altamente relacionados com os dois clusters do subgrupo 2b. Um cluster contém dois isolados clones e o outro, três isolados clones.

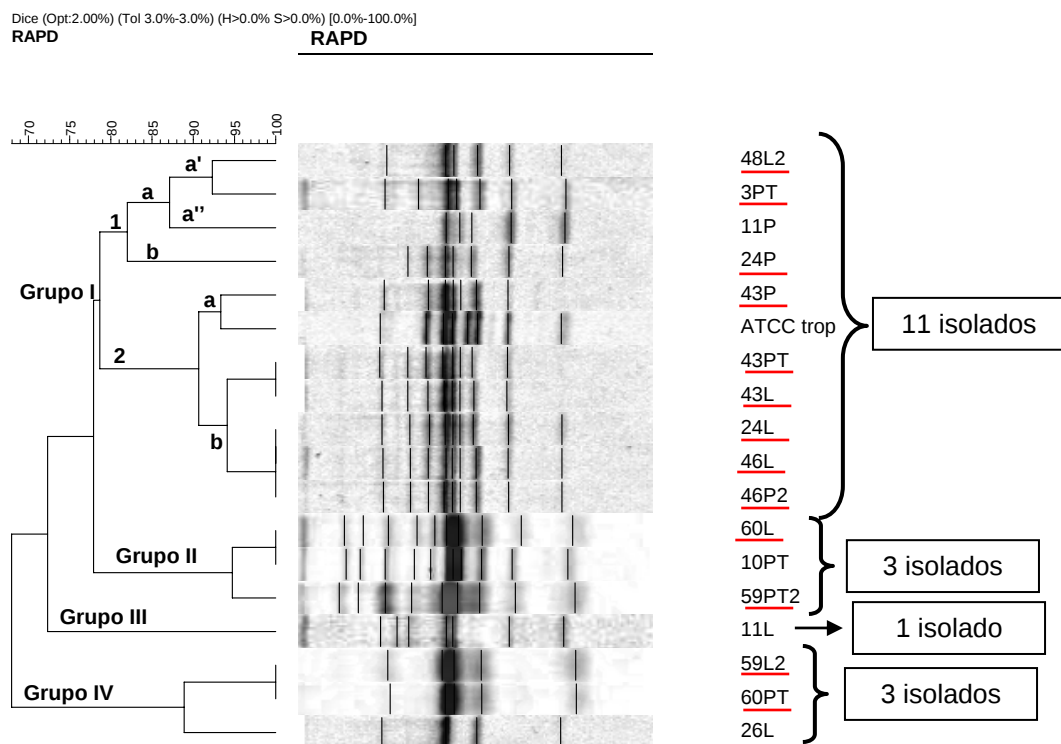


FIGURA 20 - Dendrograma dos isolados de *C. tropicalis* obtidos com o iniciador 6 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR OPA-03 (21 isolados + cepa ATCC): gerou 17 perfis genotípicos e 4 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 21. Os isolados foram classificados em 3 grupos não relacionados entre si, sendo o coeficiente de similaridade entre os grupos I e II em torno de 0,7 e abaixo de 0,5 entre o grupo III e os grupos I e II. O grupo II agrupou a maior parte dos isolados (14). Este grupo apresenta-se dividido em dois subgrupos (1 e 2) que são moderadamente relacionados (coeficiente de similaridade em torno de 0,8). O subgrupo 2 é formado por dois isolados clones e um outro isolado moderadamente relacionado a eles.

O subgrupo 1 apresenta outras subdivisões, sendo cinco subgrupos distintos (1a.a'(1), 1a.a'(2), 1a.a'', 1b.b' e 1b.b''). O 1a.a'(1) contém dois isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a eles (0,95) e que se relacionam com o isolado do 1a.a'(2) em torno de 0,9. O 1a.a'' contém dois isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a eles (0,95) e são moderadamente relacionados ao subgrupo 1a.a'. O 1b.b' contém dois isolados altamente relacionados entre si, que também são altamente relacionados (0,9) aos dois isolados do 1b.b''.

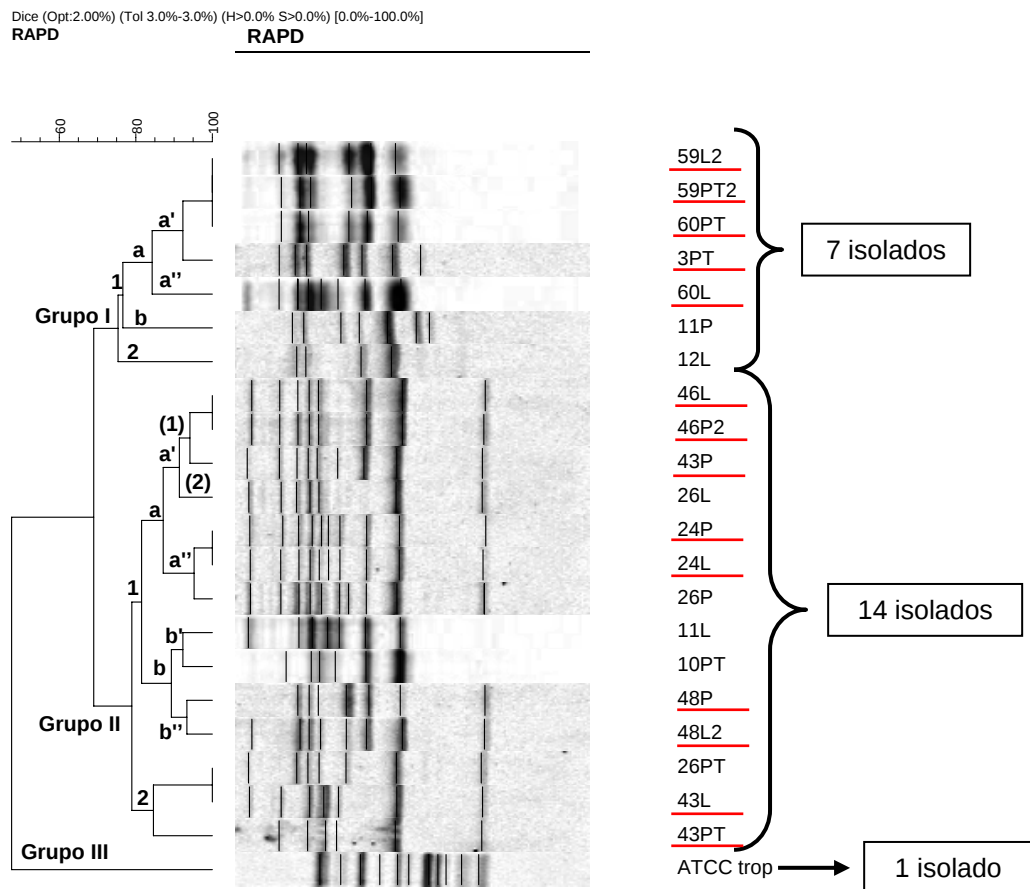


FIGURA 21 - Dendrograma dos isolados de *C. tropicalis* obtidos com o iniciador OPA-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR OPE-03 (21 isolados + cepa ATCC): gerou 15 perfis genotípicos e possui 3 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 22. Os isolados foram classificados em 3 grupos não relacionados (coeficiente de similaridade abaixo de 0,7). O grupo II contém a maioria dos isolados (14). Este grupo apresenta dois subgrupos (1 e 2) não relacionados entre si. O subgrupo 2 é formado por um único isolado. O subgrupo 1 ainda se subdivide em mais quatro subgrupos (1a.a'(1), 1a.a'(2), 1a.a'' e 1b). O 1a.a'(1) contém um cluster com seis

isolados clones e um outro isolado altamente relacionado ao cluster (0,9). O 1a.a'(2) contém um isolado que se relaciona com o subgrupo anterior em torno de 0,85. O 1a.a'' contém dois isolados altamente relacionados entre si e moderadamente relacionados com o subgrupo 1a.a'. O 1b contém dois isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a estes (coeficiente de similaridade em torno de 0,9). E que se relacionam com o subgrupo a em torno de 0,8.

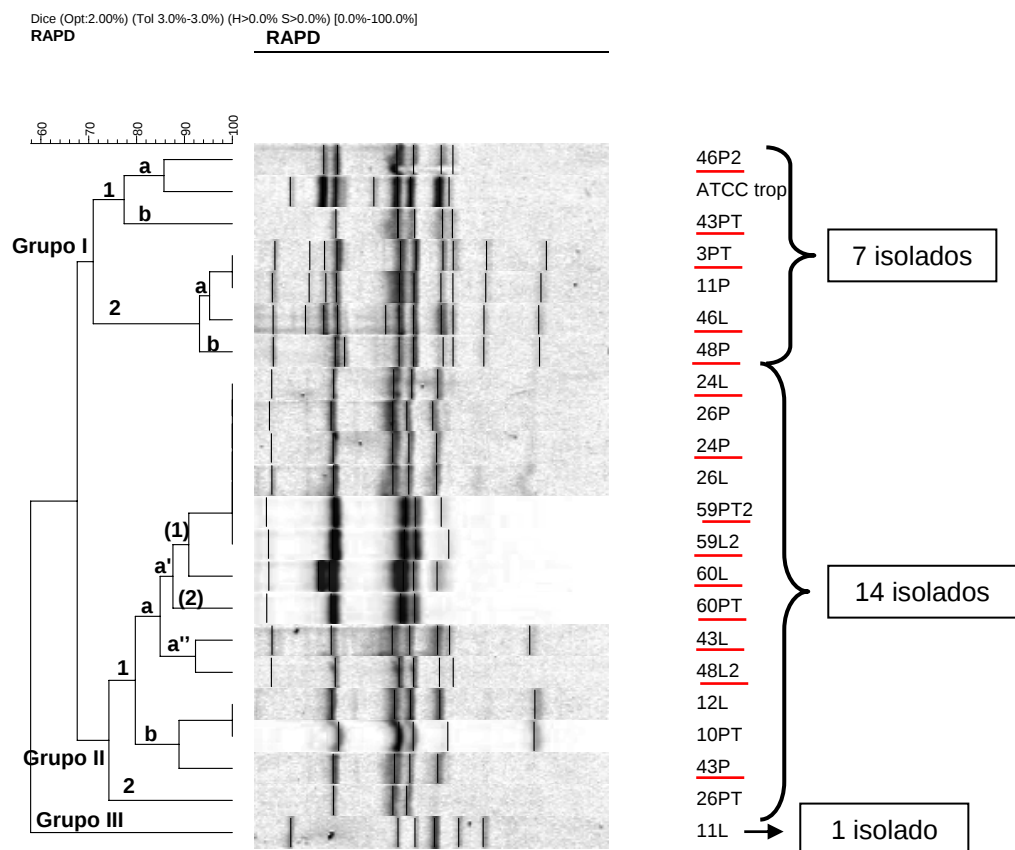


FIGURA 22 - Dendrograma dos isolados de *C. tropicalis* obtidos com o iniciador OPE-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- *C. glabrata*

Todos os dendrogramas foram gerados com a cepa ATCC 90030, e em todos os iniciadores ela gerou um perfil genotípico diferente de todos os outros isolados. Os isolados sublinhados nos dendrogramas referem-se aos indivíduos com diagnóstico de EP.

- INICIADOR 4 (7 isolados + cepa ATCC): gerou 8 perfis genotípicos. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 23. Os isolados foram classificados em 4 grupos, sendo que o grupo I contém a metade dos isolados (4). Não há similaridade entre os quatro grupos, sendo que o coeficiente de similaridade entre os grupos I e II em torno de 0,75, em torno de 0,65 entre esses dois grupos e o grupo III e abaixo de 0,5 entre os grupos III e IV.

O grupo I se divide em dois subgrupos (1 e 2) que são moderadamente relacionados entre si (coeficiente de similaridade em torno de 0,85). O subgrupo 2 contém apenas um isolado (cepa ATCC). O subgrupo 1 se subdivide ainda em mais dois subgrupos (1a e 1b). O 1a contém dois isolados altamente relacionados entre si e moderadamente relacionados ao isolado do 1b.

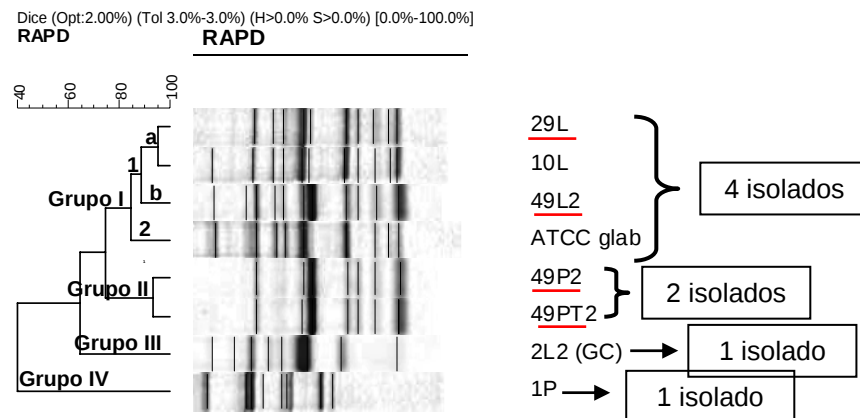


FIGURA 23 - Dendrograma dos isolados de *C. glabrata* obtidos com o iniciador 4 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR 6 (7 isolados + cepa ATCC): gerou 8 perfis genotípicos. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 24. Os isolados foram classificados em 4 grupos que não se relacionam (coeficiente de similaridade abaixo de 0,7). Os grupos I e II agrupam três isolados cada. O grupo I possui dois isolados altamente relacionados e um outro isolado moderadamente relacionado a eles. O grupo II apresenta três isolados altamente relacionados (coeficiente de similaridade em torno de 0,9).

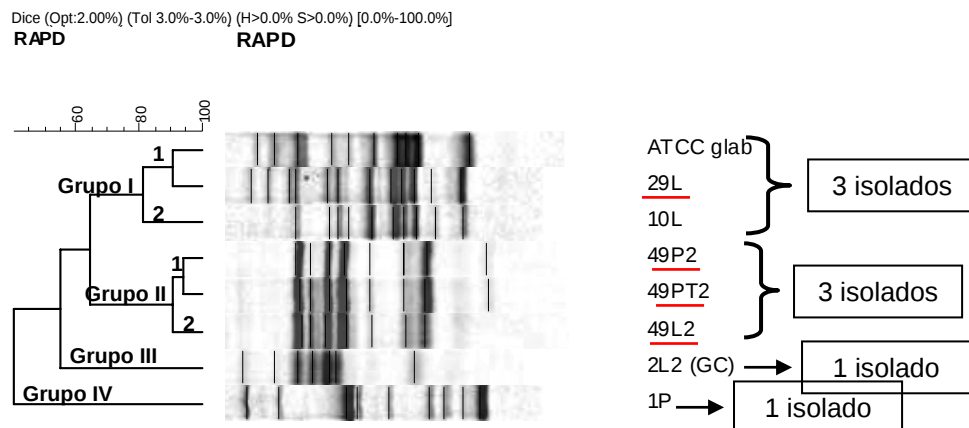


FIGURA 24 - Dendrograma dos isolados de *C. glabrata* obtidos com o iniciador 6 (Amersham Biosciences), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR OPA-03 (8 isolados + cepa ATCC): gerou 6 perfis genotípicos e 2 *clusters*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 25. Os isolados foram classificados em 3 grupos que não se relacionam (coeficiente de similaridade abaixo de 0,7). O grupo I agrupa sete isolados, e se divide em dois subgrupos (1 e 2) moderadamente relacionados. O subgrupo 2 é formado por apenas um isolado. O subgrupo 1 também se subdivide em mais dois grupos (1a e 1b). O 1a contém dois isolados clones e um outro isolado altamente relacionado a eles. O 1b contém três isolados clones, que são altamente relacionados com o subgrupo 1a.

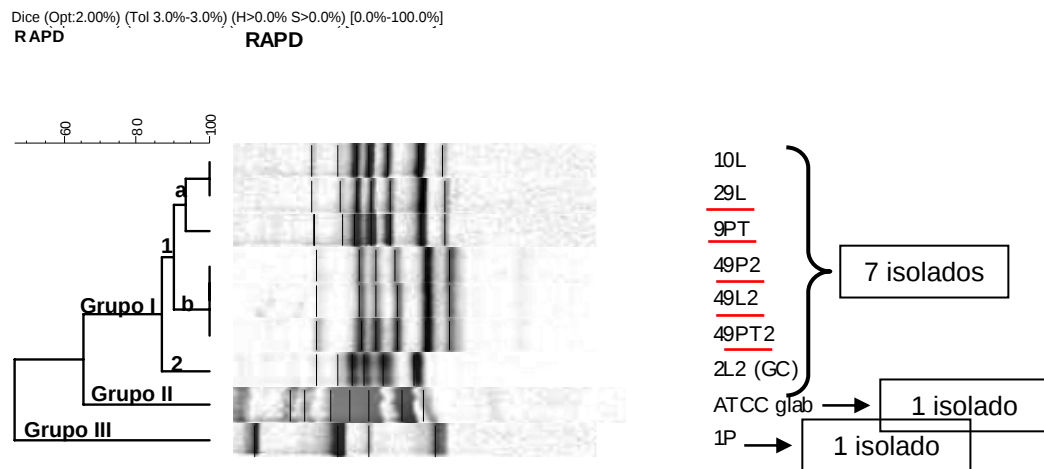


FIGURA 25 - Dendrograma dos isolados de *C. glabrata* obtidos com o iniciador OPA-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

- INICIADOR OPE-03 (8 isolados+ cepa ATCC): gerou 8 perfis genotípicos e 1 *cluster*. O dendrograma obtido pode ser observado na Figura 26. Os isolados foram classificados em 2 grupos não relacionados (coeficiente de similaridade abaixo de 0,4). O grupo II contém a maioria dos isolados (6) e se divide em dois subgrupos (1 e 2) que não se relacionam. O subgrupo 1 contém dois isolados clones e um outro isolado não relacionado a eles. O subgrupo 2 se subdivide em 2a (com dois isolados moderadamente relacionados) e 2b (com um isolado não relacionado ao subgrupo 2a).

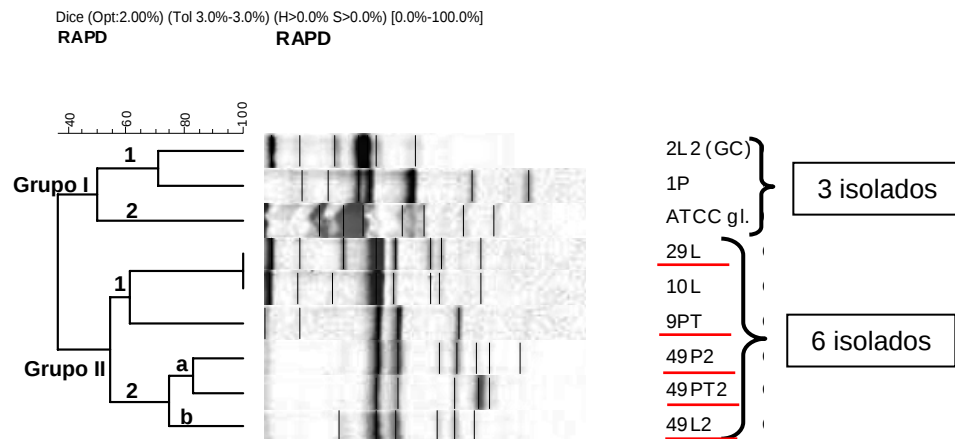


FIGURA 26 - Dendrograma dos isolados de *C. glabrata* obtidos com o iniciador OPE-03 (Operon Technologies), por RAPD. Isolados sublinhados indicam indivíduos com estomatite por prótese (EP).

4.6 Análise da Adesão

Os isolados selecionados para o estudo de adesão de *Candida* spp. em corpos de prova confeccionados com resina termopolimerizável foram baseados no agrupamento dos dendrogramas gerados para cada espécie. O iniciador que relacionou mais os isolados de cada espécie (1 para o kit Ready-To-Go/RAPD Analysis e 1 para o kit Operon) foi o escolhido para seleção dos isolados. Desta forma, foram analisados os dendrogramas dos iniciadores 4 e OPA-03 para escolha dos isolados de *C. albicans* (7 isolados grupo teste: 7PT, 8P, 25L, 30L, 50 PT, 51PT, 51L; e 2 isolados do grupo controle: 3P e 16L). Para a escolha dos isolados de *C. tropicalis* foram escolhidos os dendrogramas gerados pelos iniciadores 6 e OPA-03, com cinco isolados do grupo teste (10PT, 24L, 48L2, 59L2 e 60PT).

A média de adesão de células para os isolados de *C. albicans* no grupo teste foi de $270,7 \pm 158,6$ por mm^2 e de $521,3 \pm 146,7$ mm^2 no grupo controle (média total de $326,4 \pm 183,7$). Para os isolados de *C. tropicalis* foi de $178,5 \pm 98,1$ por mm^2 . O controle negativo não apresentou células aderidas e o controle positivo apresentou 2475 células por mm^2 .

Não foi observada diferença estatística na adesão entre as espécies ($p > 0,05$) (Figura 27) e na adesão de *C. albicans* entre o grupo teste e o grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 28).

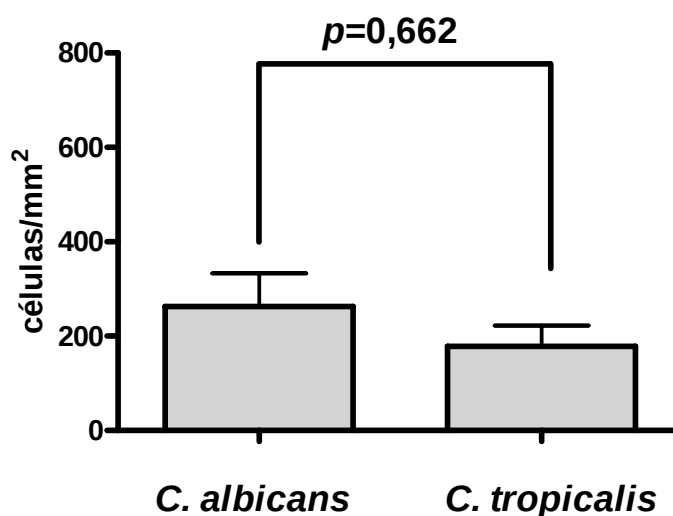


FIGURA 27 – Média e desvio padrão da contagem de células de *C. albicans* e *C. tropicalis* aderidas em corpo de prova de resina termopolimerizável no grupo teste.

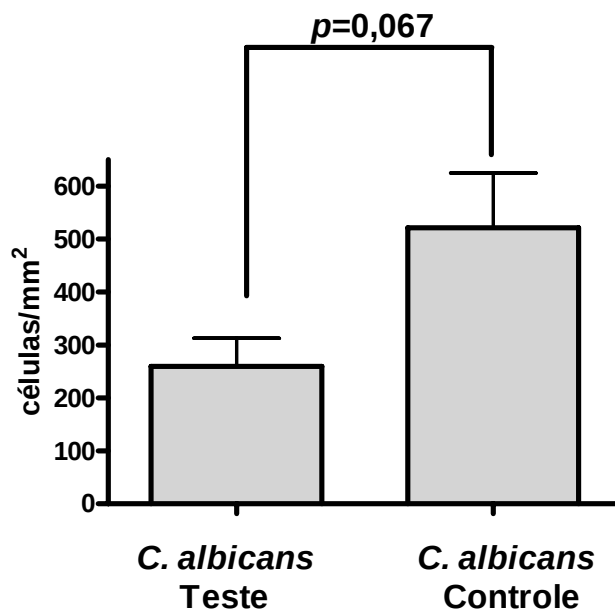


FIGURA 28 - Média e desvio padrão da contagem de células de *C. albicans* de isolados provenientes de indivíduos do grupo teste e grupo controle, aderidas em corpo de prova de resina termopolimerizável.

4.7 Análise do grupo sangüíneo

Os tipos sangüíneos analisados foram os do sistema ABO, RH, Le^a e Le^b. Em 6 indivíduos do grupo teste não foi possível obter o tipo Lewis, pois esses indivíduos não aceitaram a repetição do exame de sangue.

Sendo assim, foi feita uma análise individual para os grupos do sistema ABO e RH (Figuras 29 e 30) e uma análise conjunta, para os indivíduos identificados com os 3 sistemas (Tabela 7).

Para os fenótipos ABO e RhD foram analisados 60 indivíduos no grupo teste e 18 no grupo controle.

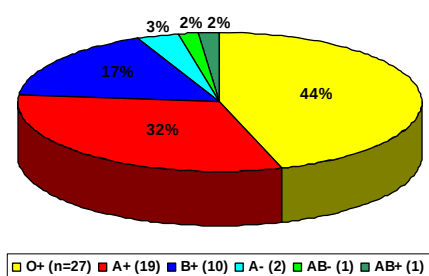


FIGURA 29 – Distribuição dos indivíduos do grupo teste ($n=60$ indivíduos) de acordo com o tipo sanguíneo nos sistemas ABO e RH.

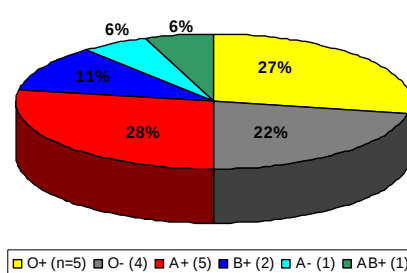


FIGURA 30 – Distribuição dos indivíduos do grupo controle ($n=18$ indivíduos) de acordo com o tipo sanguíneo nos sistemas ABO e RH.

Com a associação dos fenótipos ABO, RhD e Lewis a população analisada foi de 54 indivíduos no grupo teste e 18 no grupo controle, sendo suas distribuições apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição e freqüência dos indivíduos dos grupos teste e controle, de acordo com análise do tipo sanguíneo para antígenos dos sistemas ABO, RH e Lewis

ABO/ Rh Lewis	(a-b+)		(a+b-)		(a-b-)		NI		TOTAL	
	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC
O+	19	3	4	1	1	1	3	0	27	5
O-	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4
A+	13	5	1	0	3	0	2	0	19	5
A-	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1
B+	6	2	1	0	3	0	0	0	10	2
AB+	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
AB-	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
TOTAL	40	15	6	1	8	2	6	0	60	18

* GT = Grupo Teste, GC = Grupo Controle, NI = Não identificado

4.8 Interação entre os dados

4.8.1 Anamnese e história odontológica

Os resultados obtidos relacionando o gênero à EP, doença sistêmica, uso de medicamento, fumo e detecção de *Candida* spp., no grupo teste e no grupo controle, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição e frequência dos indivíduos para os grupos teste e controle, segundo o gênero

GRUPOS	Gênero	EP		Doença Sistêmica		Medicação		Fumante		Detecção de <i>Candida</i> spp	
		S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
TESTE	Feminino (n=47)	29	18	35	12	33	14	11	36	36	11
	Masculino (n=13)	7	6	9	4	9	4	2	11	10	3
CONTROLE	Feminino (n=12)	0	12	8	4	7	5	0	12	8	4
	Masculino (n=6)	0	6	2	4	2	4	0	6	1	5

S=Sim/ N=Não/ EP=Estomatite por prótese

Não houve diferença estatística entre os gêneros e o diagnóstico de EP no grupo teste ($p=0,847$; $\chi^2=0,03$). Também não foi encontrada diferença estatística entre os gêneros e a detecção de *Candida* spp. no grupo teste ($p=0,980$; $\chi^2=0,0006$) e no grupo controle ($p=0,133$; $\chi^2=2,25$).

Os resultados relacionando doença sistêmica, uso de medicamento e fumo, com EP e detecção de *Candida* spp. estão apresentados na Figura 31.

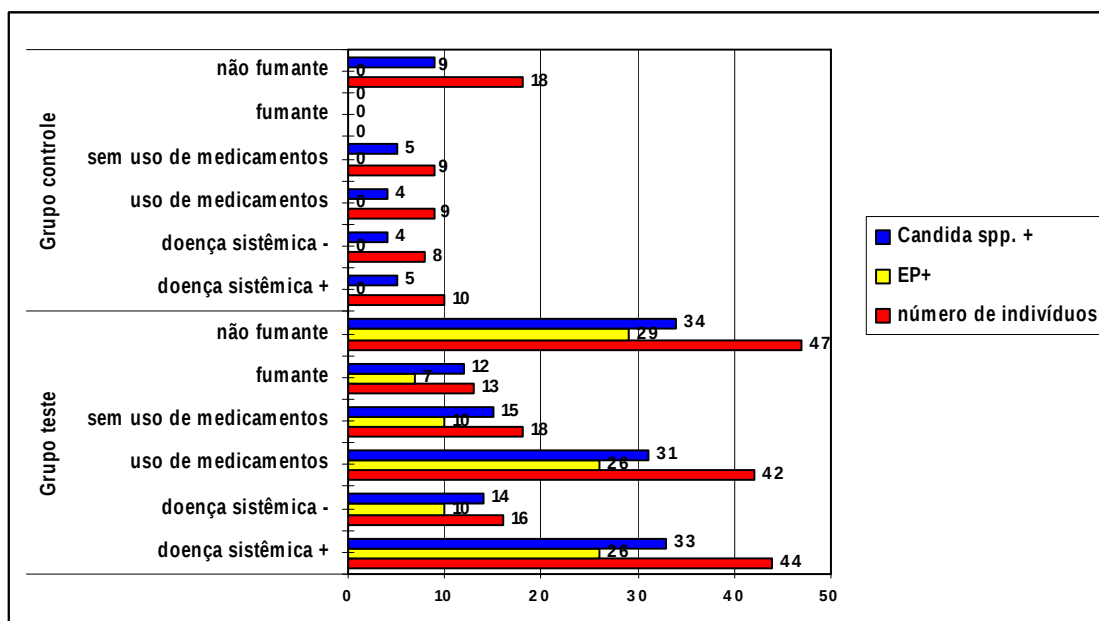


FIGURA 31 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, relacionando doença sistêmica, uso de medicamento e fumo, à estomatite por prótese (EP) e detecção de *Candida* spp..

No grupo teste não houve diferença estatística para o diagnóstico de EP entre indivíduos fumantes e não fumantes ($p=0,847$; $\chi^2=0,036$). Também não encontramos diferença estatística entre indivíduos fumantes e não fumantes e a detecção de *Candida* spp. ($p=0,25$; $\chi^2=1,29$).

O diagnóstico de EP entre os indivíduos com doença sistêmica e os sem doença sistêmica não foi estatisticamente significativo no grupo teste ($p=0,811$; $\chi^2=0,056$), assim como a detecção de *Candida* spp. entre esses indivíduos (grupo teste: $p=0,493$; $\chi^2=0,469$, e grupo controle: $p=0,678$; $\chi^2=0,045$). Não encontramos diferença estatística no diagnóstico de EP entre os indivíduos que faziam uso de medicação e os indivíduos que não o faziam ($p=0,863$; $\chi^2=0,029$). A detecção de *Candida* spp. entre

esses indivíduos (grupo teste: $p=0,641$; $\chi^2=0,2174$, e grupo controle: $p=0,345$; $\chi^2=0,678$) também não apresentou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, a presença de doença sistêmica e o uso de medicação foram correlacionados com a detecção de *Candida* spp. ($r=0,938$; $p=0,0006$ e $r=0,983$; $p=0,005$, respectivamente).

Entre os indivíduos ($n=21$) do grupo teste que relataram sintomatologia relacionada à EP, 10 apresentaram EP e em 16 casos foi detectado *Candida* spp.. Dos 4 indivíduos que apresentaram associação de sintomas tais como, queimação, ardência e/ou prurido, com o de boca seca, somente 2 apresentaram EP, mas todos foram positivos para detecção de *Candida* spp.. No grupo controle, apenas 2 indivíduos relataram sentir boca seca e somente em 1 foi detectado *Candida* spp..

Os resultados relacionando os hábitos de higiene dos indivíduos para com a prótese total e/ou cavidade bucal, para o grupo teste e grupo controle, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle quanto aos hábitos de higiene, diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção *Candida* spp.

GRUPOS	HÁBITOS DE HIGIENE	SIM			NÃO		
		<i>n</i> [#]	EP	<i>n</i> positivo para <i>Candida</i> spp ^β	<i>n</i> [#]	EP	<i>n</i> positivo para <i>Candida</i> spp ^β
TESTE	Limpeza da PT	60	36	46 / 35*	0	0	0
	Embebição da PT	26	14	17 / 11*	34	23	29 / 24*
	Limpeza da mucosa	26	18	21 / 18**	34	19	25 / 19**
	Bochecho	60	37	46	0	0	0
	Limpeza da língua	34	21	25 / 22***	26	16	21 / 19***
CONTROLE	Escovação	18	0	9	0	0	0
	Limpeza da língua	14	0	7 / 7***	4	0	2 / 2***

▪ # - *n* = número de indivíduos

▪ β - Indivíduo positivo: detecção de *Candida* spp. em alguma das amostras (P, PT ou L).

▪ *Presença de *Candida* spp. na PT superior

▪ ** Presença de *Candida* spp. na mucosa do palato

▪ *** Presença de *Candida* spp. na língua

Os hábitos de higiene analisados, em relação à cavidade bucal e PT, não apresentaram diferenças estatísticas significantes, nem com relação à EP, nem com relação à detecção de *Candida* spp., respectivamente:

- Grupo teste:

Embebição da PT: $p=0,411$; $\chi^2= 0,465$ e $p=0,133$; $\chi^2= 0,578$

Limpeza da mucosa: $p=0,431$; $\chi^2= 0,123$ e $p=0,727$; $\chi^2= 0,342$

Limpeza da língua: $p=0,985$; $\chi^2= 0,034$ e $p=0,72$; $\chi^2= 0,374$

- Grupo controle: Limpeza da língua: $p=0,99$; $\chi^2= 0,043$

4.8.2 Exame clínico intra bucal

O grupo controle não apresentou indivíduos com sinais clínicos de infecção por *Candida* spp.. Além disso, notamos que os indivíduos em que não foi detectado *Candida* spp., apresentavam menor índice de CPOD ($p=0,027$). Ainda neste grupo, os indivíduos que escovavam a língua apresentaram menor índice de placa ($p=0,046$) e maior recessão gengival ($p=0,045$).

Já no grupo teste, 36 indivíduos apresentaram EP, sendo que em 30 houve detecção de *Candida* spp.. No grupo teste, foi encontrada correlação na detecção de *Candida* spp. entre os indivíduos que apresentavam EP e os indivíduos que não apresentavam EP ($p=0,033$; $\chi^2=4,54$).

4.8.3 Avaliação das próteses totais superiores

Os resultados relacionando a frequência de uso da prótese total superior, o diagnóstico de EP e detecção de *Candida* spp. estão apresentados na Tabela 10. Foi encontrada uma correlação *board line* entre os indivíduos que faziam uso contínuo da prótese total superior e a presença de EP ($r=0,05$; $\chi^2=3,857$). Essa correlação não foi encontrada em relação à detecção de *Candida* spp. ($p=0,99$; $\chi^2=0,033$).

Tabela 10 - Frequência do uso das próteses totais relacionado à estomatite por prótese (EP) e detecção de *Candida* spp. nos indivíduos do grupo teste

Frequência de uso	Gênero (f:m)	EP	Detecção de <i>Candida</i> spp.
Contínuo (n=44)	35:9	30	34
Diurno (n=15)	12:3	6	11
Esporádico (n=1)	0:1	0	1

Os resultados obtidos quanto à qualidade e qualificação da higiene da prótese total superior em relação à EP e detecção de *Candida* spp. encontram-se descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição dos indivíduos do grupo teste, segundo a qualidade e higiene da prótese total (PT), diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção de *Candida* spp.

	Qualidade das PTs Superiores (pontuação)*								Total	Higiene das PTs Superiores				Total
	0	1	2	3	4	5	6	7		RUIM	REGULAR	BOA	ÓTIMA	
n**	1	5	18	21	8	7	0	0	60	54	2	3	1	60
EP	1	3	14	8	5	5	0	0	36	34	1	1	0	36
Detecção <i>Candida</i> spp.	1	3	16	15	5	6	0	0	46	44	1	1	0	46

* Pontuação obtida dos critérios adaptados de Rise⁹⁶ (1979).

** n = número de indivíduos

A qualidade das próteses foi associada estatisticamente ao diagnóstico de EP ($p < 0,0001$, $\chi^2 = 53,7$) e a detecção de *Candida* spp. ($p < 0,0001$; $\chi^2 = 53,07$).

Quanto à qualificação da higiene das PTs, foi encontrada associação entre higiene ruim e diagnóstico de EP ($p<0,0001$; $\chi^2=21,56$) e entre higiene ruim e detecção de *Candida* spp. ($p<0,0001$; $\chi^2=31,04$).

4.8.4 Análise Micológica

A detecção de *Candida* spp. no palato foi correlacionada com a presença de EP ($p=0,004$). Entretanto não foi encontrada correlação entre as espécies de *Candida* identificadas e a presença de EP ($p>0,05$).

4.8.5 Análise Genética

A avaliação da genotipagem, por meio dos dendrogramas obtidos, nos permitiu observar diferenças individuais entre os iniciadores.

- *Candida albicans*:

Comparando-se os iniciadores 4 e 6, encontramos que o iniciador 4 produziu padrões genotípicos mais relacionados e em um único grupo, para a maioria dos isolados, do que o iniciador 6, que dividiu a maior parte dos isolados em dois grupos não relacionados. Embora o iniciador 6 apresente maior número de isolados clones, o relacionamento entre estes *clusters* é baixo ou inexistente. O iniciador 4 apresentou maior número de *clusters* embora com menor número de isolados clones, mas com maior relacionamento entre estes *clusters*. Já para os iniciadores OPA-03 e OPE-03, o iniciador OPA-03 produziu padrões genotípicos mais relacionados e em um único grupo, para a maior parte dos isolados, do que o iniciador OPE-03, que dividiu a maior parte dos isolados em dois

grupos não relacionados. Embora o iniciador OPE-03 tenha apresentado um *cluster* a mais que o OPA-03, este último apresentou maior número de clones, com relacionamento maior entre estes clusters.

Os iniciadores da Qiagen-Operon amplificaram mais isolados do que os iniciadores da Amersham Biosciences e perfis genotípicos com maior número de bandas. Podemos observar também que um iniciador da Amersham Biosciences e um da Operon Technologies (4 e OPA-03, respectivamente) agruparam a maior parte dos isolados em um único grupo e os dois iniciadores (6 e OPE-03) apresentaram a maior parte dos isolados divididos em dois grupos.

- *Candida tropicalis*:

Para os isolados de *C. tropicalis*, o iniciador 6 apresentou um grupo contendo a maior parte dos isolados, enquanto no iniciador 4, a maioria dos isolados se dividem em dois grupos não relacionados. Apesar de os dois iniciadores apresentarem grupos pouco relacionados entre si. Os dois iniciadores apresentaram o mesmo número de *clusters* e semelhança no número de clones. Entretanto, o iniciador 6 gerou maior relacionamento entre os isolados por eles estarem concentrado num mesmo grupo. Para os iniciadores OPA-03 e OPE-03, embora os dois agrupassem a maioria dos isolados em um único grupo, o iniciador OPA-03 apresentou os isolados deste grupo mais relacionados entre si do que o iniciador OPE-03. Este último apresentou maior número de isolados clones, embora menor número de *clusters* que o iniciador OPA-03.

Os iniciadores da Operon Technologies também amplificaram mais isolados, entretanto, os padrões genotípicos gerados são semelhantes com os iniciadores da Amersham Biosciences.

- *Candida glabrata*:

Os isolados de *C. glabrata* foram pouco relacionados nos 4 iniciadores e somente os iniciadores da Operon Technologies geraram clones. Nestes resultados, devemos considerar que o número de isolados é bastante reduzido.

Comparando-se os iniciadores 4 e 6, temos que o iniciador 4 apresentou mais isolados em um só grupo e com maior relacionamento do que o iniciador 6. Para os iniciadores OPA-03 e OPE-03, os isolados foram mais relacionados no iniciador OPA-03 que também agrupou mais isolados em um só grupo. O iniciador OPE-03 dividiu os isolados em dois grupos não relacionados entre si. Além disso, o iniciador OPA-03 apresentou mais *clusters* e maior número de isolados clones. A quantidade de amplificação entre todos os iniciadores foi bastante similar. Entretanto os iniciadores da Amersham Biosciences geraram perfis genotípicos com maior número de bandas que os iniciadores da Operon Technologies.

Apesar dessas diferenças individuais, quando a genotipagem apresentada por cada iniciador foi avaliada com outras variáveis do estudo, como o diagnóstico de EP, sítio de coleta, doença sistêmica ou uso de medicação, não obtivemos nenhuma relação positiva com nenhum

dos iniciadores. Isto é, não detectamos um perfil genotípico que estivesse relacionado com essas variáveis. Embora cada iniciador tenha agrupado os isolados de uma determinada forma, variando inclusive os clones encontrados em cada um, para as amostras deste estudo, essas diferenças não influenciaram nos resultados obtidos.

4.8.6 Análise da Adesão

Quanto à adesão de *Candida* spp. em resina termopolimerizável, os dados quanto ao número de células por mm² e diagnóstico de EP nos respectivos indivíduos estão apresentados na Tabela 12.

Não houve diferenças significativas na adesão em relação a quantidade de células aderidas e diagnóstico de EP, e na adesão entre as espécies, assim como entre *C. albicans* do grupo teste e controle ($p>0,05$), demonstrando uma homogeneidade da amostra.

Tabela 12 – Média do número de células aderidas por mm² em corpo de prova de resina termopolimerizável, para isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*, nos indivíduos dos grupos teste e controle

		Isolado	nº de células aderidas por mm ²	EP
GRUPO TESTE	<i>C. albicans</i>	7PT	250	S
		8P	592,5	S
		25L	142,5	N
		30L	107,5	S
		50PT	242,5	S
		51PT	242,5	S
	51L	317,5	S	
	<i>C. tropicalis</i>	10PT	182,5	N
		24L	282,5	S
		48L2	267,5	S
		59L2	67,5	S
60PT		92,5	S	
GRUPO CONTROLE	<i>C. albicans</i>	3P	417,5	N
		16L	625	N
Controles da Metodologia		Positivo	2475	---
		Negativo	0	---

- P=Palato; PT= Prótese Total; L= Língua

- EP= Estomatite por Prótese Total

- S=Sim; N=Não

4.8.7 Análise do grupo sangüíneo

Os resultados referentes às avaliações dos grupos sangüíneos dos indivíduos, diagnóstico de EP e detecção de *Candida* spp. estão apresentados na Figura 32 e Tabelas 13 e 14, de acordo com os antígenos ABO e RhD; Lewis; e ABO, RhD e Lewis, respectivamente.

Encontramos significância estatística, nos sistemas ABO e RH, entre o grupo O Rh+ e EP, e entre o grupo A Rh+ e detecção de *Candida* spp.. Para o sistema Lewis, não obtivemos estatística significativa entre

estado secretor e diagnóstico de EP assim como entre estado secretor e detecção de *Candida* spp..

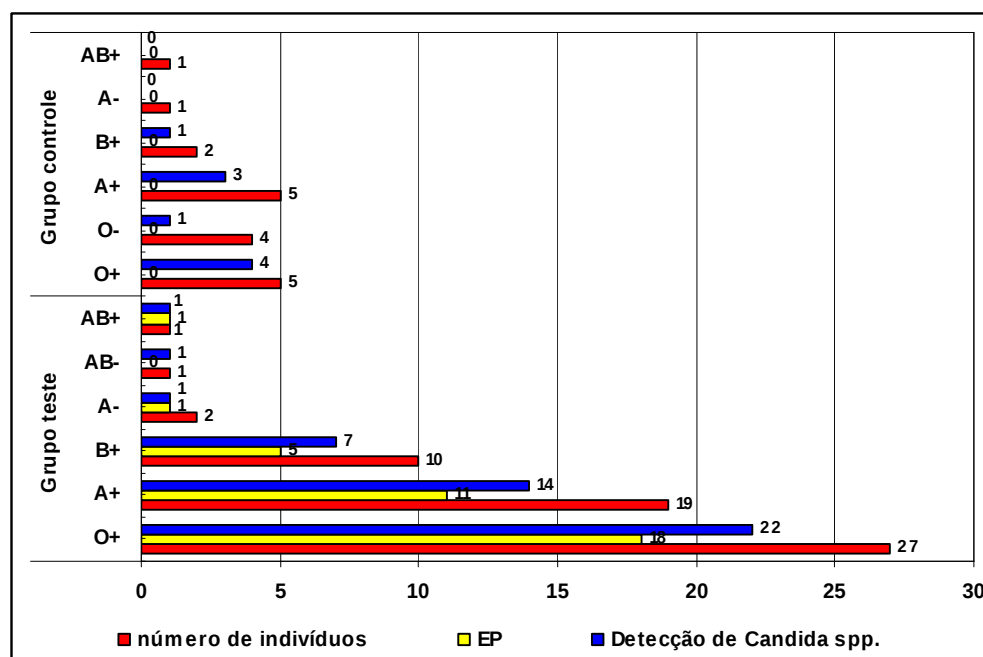


FIGURA 32 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, segundo análise do grupo sanguíneo (sistemas ABO e RH), estomatite por prótese (EP) e detecção de *Candida* spp..

Tabela 13 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, segundo análise do tipo sanguíneo Lewis, diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção *Candida* spp.

	Le (a- b+)		Le (a+ b-)		Le (a- b-)		NI	
	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC
N	40	15	6	1	8	2	6	0
EP	24	0	3	0	5	0	4	0
Detecção de <i>Candida</i> spp.	32	7	5	1	4	1	5	0

n=número de indivíduos/ NI= Não identificado/ GT= Grupo Teste/ GC= Grupo Controle

Tabela 14 – Distribuição dos indivíduos dos grupos teste e controle, segundo análise dos fenótipos ABO, RhD e Lewis, diagnóstico de estomatite por prótese (EP) e detecção *Candida* spp.

GRUPOS SANGÜÍNEOS	<i>n</i>		EP		Detecção de <i>Candida</i> spp.	
	GT	GC	GT	GC	GT	GC
O+ Le (a-b+)	19	3	14	0	17	2
O+ Le (a+b-)	4	1	2	0	3	1
O+ Le (a-b-)	1	1	0	0	0	1
O- Le (a-b+)	0	4	0	0	0	1
A+ Le (a-b+)	13	5	6	0	9	3
A+ Le (a-b-)	3	0	2	0	2	0
A+ Le (a+b-)	1	0	1	0	1	0
A- Le (a-b+)	2	1	1	0	1	0
B+ Le (a-b+)	6	2	3	0	5	1
B+ Le (a+b-)	1	0	0	0	1	0
B+ Le (a-b-)	3	0	2	0	1	0
AB+ Le (a-b-)	1	1	1	0	1	0
Sem identificação com sistema Lewis	6	0	4	0	5	0
TOTAL	60	18	36	0	46	9

n = número de indivíduos, GT= grupo teste, GC= grupo controle.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Embora a EP seja objeto de vários estudos, na busca da identificação ou definição dos fatores etiológicos envolvidos em sua promoção e manutenção, ainda não existe um consenso nas metodologias propostas e nos resultados encontrados, tornando a EP ainda um tema bastante discutido e objeto de estudos recentes. Com base nessas observações, nosso estudo propôs uma avaliação dos fatores etiológicos relacionados à EP e suas correlações, utilizando-se de metodologia clínica e laboratorial embasadas na literatura relacionada.

Entre os critérios para o diagnóstico clínico da EP, a maioria dos estudos^{3,4,5,43,52,59,103,117}, assim como o nosso, utiliza a classificação descrita por Newton⁷⁹ (1962). O grupo controle deste estudo, não apresentou EP, uma vez que foi composto por indivíduos dentados e que a presença de prótese removível foi um critério de exclusão. No grupo teste, composto por indivíduos desdentados e usuários de prótese total superior, a prevalência de EP foi de 60%, resultado semelhante ao encontrado em outros estudos^{3,5,28,43,58}, e dentro da amplitude de 11 à 67% considerada pela literatura^{39,90,94,116,117}.

A detecção de *Candida* spp. têm sido maior nos indivíduos que apresentam EP^{4,58,117}, o que também foi observado em nosso estudo. Esta observação poderia sugerir que a *Candida* spp. é um fator causal da EP¹¹⁷. Por outro lado, Kulak-Ozkan et al.⁶¹ (2002), consideram que a presença de *Candida* spp. em indivíduos que não apresentam diagnóstico

clínico de EP poderia ser reflexo do método ou sítio de coleta e dos critérios de seleção dos indivíduos. Consideramos, assim como Wilson¹¹⁷ (1998), que a detecção de *Candida* spp. pode ser explicada pelo fato da *Candida* spp. ser um microrganismo comensal e bastante freqüente na cavidade bucal, não sendo surpresa encontrá-la na maioria dos casos, tal como no grupo controle deste estudo. Neste grupo, *Candida* spp. foi detectada em 50% dos indivíduos, embora tenha sido mais detectada nos indivíduos que apresentaram maior índice de CPOD.

No grupo teste a detecção de *Candida* spp. foi em 76,7% dos indivíduos, percentual semelhante a outros estudos, como os 79,41% de Kreher et al.⁵⁸ (1991), 63% de Blair et al.¹² (1995) e 82,66% de Jorge et al.⁵⁴ (1997). Entretanto, esta porcentagem é maior do que a relatada em outros estudos como os de Oliver e Shillito⁸⁶ (1984), que detectaram *Candida* spp. em 35% dos indivíduos, Schou et al.¹⁰⁴ (1987) em 38,6%, Vigild et al.¹¹⁴ (1987), em 46%, Cuming et al.²⁸ (1990), em 42% e Kulak-Ozkan et al.⁶¹ (2002), em 38,6%. Esta variação, também considerada por outros autores^{16,25,90}, ocorre provavelmente pelos diferentes métodos de coleta utilizados nos estudos (*swab*, *imprint*, saliva, bochecho).

Observamos que do total de indivíduos do grupo teste, 60% apresentaram EP e destes, 83,3% foram positivos para a detecção de *Candida* spp.. Barbeau et al.⁵ (2003) encontraram 76,6% dos indivíduos com EP e em somente 40,4% destes, foi detectada *Candida* spp.. Assim como em outros estudos^{28,61}, encontramos correlação estatística entre EP

e detecção de *Candida* spp., ainda que, Barbeau et al.⁵ (2003), sugeriram que a detecção de *Candida* spp. esteja mais relacionada com a extensão da inflamação provocada pela EP.

Apesar de alguns estudos relatarem uma maior diversidade de espécies de *Candida* detectadas nos indivíduos com EP^{5,54}. *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada em nossa amostra, concordando com estudos prévios^{5,12,16,25,28,34,48,58,61,104}. Embora em menor proporção, outras espécies também foram identificadas, sendo *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. sphaerica*, *C. famata* e *Pichia ohmeri*. As três primeiras espécies também são relatadas em outros estudos^{12,28,34,58,61,104}. *C. lusitaniae*, *C. famata* e *Pichia Ohmeri* não são espécies frequentemente encontradas, principalmente nos estudos relacionados a EP, embora sejam importantes, uma vez que são espécies bastante resistentes. *C. lusitaniae* e *Pichia ohmeri* foram espécies encontradas em dois indivíduos com diagnóstico clínico de EP do nosso grupo teste, sendo *C. lusitaniae* detectada em um indivíduo em 2 sítios de coleta (palato e língua) e associada com *C. glabrata* (detectada na prótese total) e *Pichia ohmeri* nos três sítios de coleta de outro indivíduo. O indivíduo em que foi detectado *C. lusitaniae* não relatou problemas sistêmicos e não fazia uso de medicação, e o indivíduo em que foi detectado *Pichia ohmeri* relatou hipertensão e uso de antihipertensivo. *C. famata* foi detectada em dois indivíduos do grupo controle, ambos coletados da língua. Esses dois indivíduos não faziam uso de medicação,

apesar de um relatar hipoglicemia. *C. sphaerica* foi detectada em um sítio de um indivíduo com diagnóstico clínico de EP do nosso grupo teste. É uma espécie comumente encontrada no queijo mussarela. Buford-Mason et al.¹⁹ (1988) já relatavam a detecção de *C. albicans* viável em alimentos como cereais, saladas, frutas e sucos, além de uma variedade de itens desidratados, em conserva e pasteurizados. Dessa forma, a detecção de *C. sphaerica* neste indivíduo pode estar relacionada com seus hábitos alimentares.

Observamos ainda, a detecção de mais de uma espécie de *Candida* no mesmo indivíduo ou sítio de coleta, como descrito em outros estudos^{5,12,25,48,58}. Essas associações foram mais freqüentes nos indivíduos com diagnóstico de EP, o que também foi relatado por Barbeau et al.⁵ (2003). Entre as associações detectadas neste estudo (*C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. famata*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae*) a mais freqüente foi entre *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Arendorf e Walker³ (1980) relataram que a *Candida* spp. não está uniformemente distribuída na cavidade bucal. Isto poderia explicar diferenças na detecção de *Candida* spp. entre os sítios de coleta, como obtido por Oliver e Shilitoe⁸⁶ (1984) que relataram a língua como o sítio onde mais se isolou *C. albicans*. Entretanto, assim como Kuc et al.⁵⁹

(1999), não encontramos diferença significativa para detecção de *Candida* spp. entre os sítios analisados.

Entre as técnicas descritas para a coleta micológica, as mais comuns são a do *swab*^{28,48,57,60,104} e a da impressão (*imprint*)^{3,12}. Esta última é considerada por Arendorf e Walker³ (1980) a melhor técnica para obtenção de amostras das superfícies mucosas (principalmente da mucosa palatina) e da superfície da prótese, detectando até 15% mais *Candida* spp., além de ser uma técnica que permite boa padronização¹⁰⁰, sendo a técnica eleita para nosso estudo.

A utilização de um meio seletivo, como o CHROMagar *Candida*, e de um kit comercial para identificação das espécies de *Candida*, como o API 20C AUX, têm sido mais comumente encontradas na literatura^{5,8,27,30,31,34,41,42,48,65,94}. Beighton et al.⁸ (1995) consideram que o uso do CHROMagar facilita o estudo de fungos associados com doenças bucais. Entretanto, a correlação entre cor e definição da espécie neste meio, nem sempre se apresenta determinante, considerando que em 34,2% dos isolados de *Candida* spp. do grupo teste e em 14,3% do grupo controle a cor observada não foi compatível com a identificação da espécie de *Candida* pelos métodos clássicos. Por outro lado, o sistema API 20C AUX permite uma identificação rápida e prática das leveduras, porém é mais dispendioso, tornando-o menos acessível ao uso rotineiro.

O fenótipo mais frequentemente encontrado no sistema API 20C AUX foi o 2.576.174, o qual identifica *C. albicans*, sendo encontrado em

78,6% e 31,2% dos isolados do grupo controle e teste, respectivamente. Hannula et al.⁴⁸ (1997) também relatam prevalência deste fenótipo, numa proporção de 79% de seus isolados.

Adicionalmente, os métodos moleculares também têm sido utilizados com maior frequência em estudos de infecções orais^{2,46,47,64,68,91,101}, auxiliando na compreensão da patogenicidade do fungo. Entre essas técnicas, a de RAPD, tem se mostrado útil em estudos que analisam amostras da cavidade bucal^{24,32,46,51,74,75,115}, permitindo investigar a identidade da espécie, diversidade genética dos isolados, microevolução de uma cepa, transmissão, persistência e resistência de cepas ou de infecções^{2,48,76}. Sua capacidade em discriminar espécies ou isolados é diretamente dependente da escolha dos iniciadores^{7,47}, e o poder discriminatório desta técnica pode aumentar com o uso de mais de um iniciador⁷. Entretanto, a técnica é susceptível a variações, que podem afetar o poder desse efeito discriminatório e a reprodutibilidade deste sistema. Entre essas variações podemos citar modificações na concentração de cloreto de magnésio, número de ciclos, tipo de polimerase e temperatura de anelamento⁷. Considerando essa susceptibilidade, utilizamos a mesma metodologia para os quatro iniciadores selecionados para este estudo.

Como relatado por Pinto et al.⁸⁸ (2004) e por Leung et al.⁶⁴ (2000) observamos que alguns iniciadores utilizados neste estudo não foram capazes de diferenciar os genótipos dos diferentes isolados de *Candida*

spp.. Encontramos considerável variação entre os iniciadores utilizados e quando comparamos os iniciadores 4 e 6 com os iniciadores OPA-03 e OPE-03, esta variação foi maior.

Apesar disso, quando analisamos a associação entre os perfis genotípicos gerados e o diagnóstico de EP, ou sítio de coleta, ou presença de doença sistêmica, ou uso de medicamento ou hábito de fumar, não observamos correlação positiva, com nenhum dos iniciadores. Assim, não encontramos um perfil genotípico que estivesse associado com os fatores relacionados à patogênese da EP. Esta ausência de correlação também foi relatada por Lian et al.⁶⁵ (2004), embora em estudo de candidose vaginal.

Entre as espécies avaliadas na genotipagem (*C.albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), notamos a presença de um perfil genotípico distinto para cada espécie. A diversidade genotípica dos isolados de cada espécie, poderia ser considerada normal, refletindo a heterogeneidade da população em geral. Por outro lado, Al-Karaawi et al.² (2002) relatam que cepas de *C. albicans* tendem a ser geneticamente mais similares quando isolados entre indivíduos com variáveis semelhantes, como por exemplo, entre indivíduos HIV soropositivos e soronegativos, localização geográfica ou sítios de coleta. A aplicação deste princípio na nossa amostragem do grupo teste (usuários de prótese total) e do grupo controle (indivíduos dentados), não mostrou essa similaridade considerando a mesma localização geográfica desses indivíduos (região de Araraquara) e os

mesmos sítios de coleta. Boldo et al.¹³ (2003) também não obtiveram correlação com a origem geográfica ou características clínicas (sítio de coleta, presença de doenças e susceptibilidade antifúngica) entre os perfis encontrados, embora os resultados de Qi et al.⁹¹ (2005) demonstrem similaridade de genótipos na cavidade bucal de indivíduos jovens saudáveis, e os de Hannula et al.⁴⁹ (2001) demonstrem maior similaridade dos isolados quando comparados com a localização geográfica.

Considerando os isolados de um mesmo indivíduo, Pinto et al.⁸⁸ (2004) constataram que os perfis genotípicos possuem maior similaridade. Entretanto, em nossos resultados podemos observar tanto alta, quanto baixa similaridade entre isolados do mesmo indivíduo, dependendo do iniciador avaliado. Considerando a similaridade dos isolados com cepas de referência, na maioria dos dendrogramas elas foram pouco relacionadas aos isolados clínicos, ao contrário do relatado por Pinto et al.⁸⁸ (2004), que obtiveram perfis similares entre os isolados clínicos e as cepas de referência.

Como já relatado anteriormente, a detecção de *Candida* spp. parece estar mais relacionada à microbiota oral do que a presença de EP. Entretanto, a proliferação de *Candida* spp., pode ser causada pela alteração que a prótese total causa no micro-ambiente bucal, produzindo condições mais favoráveis para o desenvolvimento da EP¹¹⁷. Dessa forma, este estudo também avaliou fatores como a experiência do

indivíduo com o uso de prótese total, idade, qualidade, frequência de uso e limpeza dessas próteses.

A experiência dos indivíduos avaliados quanto ao uso de prótese total foi de aproximadamente 28 anos e a idade das próteses atuais, aproximadamente 20 anos. Estes resultados revelam uma triste realidade, pois considerando que a média de idade destes indivíduos foi de aproximadamente 62 anos, podemos constatar que a necessidade de um tratamento reabilitador com próteses totais foi precoce, e a procura pela manutenção deste tratamento foi precária, considerando a média alta de idade encontrada nas próteses atuais. Por si só, estes fatores já resultam em problemas para esses indivíduos, pois além da reabsorção óssea fisiológica, há uma adaptação do sistema estomatognático para tentar compensar as perdas, gerando disfunções, dores, ferimentos de mucosa, entre outros. Quando associados à outras variáveis, como as analisadas neste estudo, temos um aumento no potencial de se desenvolver patologias, sejam elas simples ou complexas. Complementarmente, Dormenval et al.³⁶ (1999), atribuem os problemas nutricionais severos, apresentados pelos indivíduos de seu estudo, à falta de qualidade das próteses para a função do sistema mastigatório. Budtz-Jorgensen¹⁵ (1981) e Jeganathan et al.⁵² (1997) relatam ainda que próteses antigas podem predispor a EP, pois além de causar traumas físicos na mucosa subjacente, a superfície do material torna-se porosa, dificultando a higienização. Moskona e Kaplan⁷⁷ (1992) relatam que a etiologia da EP

está mais relacionada com a idade das próteses do que com a qualidade. Entretanto, esses dois fatores estão diretamente relacionados uma vez que o problema de uma prótese antiga é justamente a perda da qualidade da mesma, seja funcional, estética ou estrutural.

Em nosso estudo, as próteses foram classificadas com uma pontuação mínima de zero (prótese totalmente adequada) à máxima de 7 (prótese totalmente inadequada), sendo que a maioria obteve pontuação 3 (35%), seguida pela pontuação 2 (30%). Considerando que a média de idade das próteses totais foi alta, era esperado que apresentassem pontuações maiores, indicando menor qualidade. Mesmo assim nossos resultados demonstraram correlação positiva entre a qualidade que a prótese apresentou e o diagnóstico de EP, concordando com Oliveira et al.⁸⁵ (2000), e correlação entre a qualidade da prótese e detecção de *Candida* spp., o que também foi observado em estudo anterior³⁴. Entre os índices que classificaram a qualidade das próteses, o que mais se destacou foi o material, considerado insatisfatório em 93,3% das próteses, que a nosso ver está diretamente relacionado à média de idade alta das próteses. Isto certamente compromete a sua qualidade, favorecendo a adesão de *Candida* spp.¹⁰⁵ e atuando como um reservatório da infecção⁵⁹.

A exposição contínua da mucosa palatina a esse reservatório, através do uso contínuo da prótese, pode aumentar a prevalência de EP^{3,16,105}. Apesar de Kreher et al.⁵⁸ (1991), relatarem uma baixa porcentagem (14,7%) de indivíduos que faziam uso contínuo da prótese,

em nosso estudo a maioria dos indivíduos (73,3%) relataram essa forma de uso. Esse resultado era esperado, porém indica que estes indivíduos não estão conscientizados de que a prótese é um aparelho que deve ser removido em algum período do dia para permitir um descanso ou alívio da mucosa. Neste quesito, assim como Crocket et al.²⁵ (1992) e Oliveira et al.⁸⁵ (2000), não encontramos correlação entre uso contínuo da prótese total e diagnóstico de EP. Porém, Vigild et al.¹¹⁴ (1987) e Shulman et al.¹⁰⁸ (2005), relataram um aumento significativo na prevalência de EP quando do uso contínuo da prótese. Nossos resultados também não demonstraram correlação entre o uso contínuo da prótese e a detecção de *Candida* spp., embora Arendorf e Walker³ (1980), Kreher et al.⁵⁸ (1991), e Jorge et al.⁵⁴ (1997), tenham relatado maior detecção de *Candida* spp. nesses indivíduos.

Outro fator frequentemente relacionado à etiologia da EP é a deficiência na limpeza da prótese total^{4,10,12,25,61}.

Avaliando os hábitos de higiene dos indivíduos deste estudo encontramos valores baixos para a higienização da mucosa do palato (43,3%), da língua (56,7%) e para a embebição da prótese em solução de limpeza (43,3%). Mesmo assim, não encontramos relação estatisticamente significativa entre a prática desses hábitos e o diagnóstico de EP ou para a detecção de *Candida* spp.. Embora 100% dos indivíduos relatassem fazer a higienização das próteses, 90% destas apresentaram grau ruim de higienização. Isto pode ser explicado pela

falta de destreza manual e/ou diminuição da acuidade visual destes indivíduos, falta de instrução por parte de um profissional ou falta de material adequado para esta limpeza, como o uso de escovas desenvolvidas para esta finalidade. Além disso, os indivíduos não têm conhecimento sobre biofilme, acreditando que suas próteses estão limpas quando não apresentam restos alimentares. Em nossos resultados encontramos correlação estatística entre higiene ruim da prótese e diagnóstico de EP, concordando com outros estudos^{10,12,52,61,114}. Também encontramos correlação entre higiene ruim da prótese e detecção de *Candida* spp., assim como relatado por Budtz-Jorgensen et al.¹⁶ (1975), d'Avila³⁴ (2003) e Kulak-Ozkan et al.⁶¹ (2002) embora Schou et al.¹⁰⁴ (1987) e Oliveira et al.⁸⁵ (2000), não tenham obtido esta relação.

Considerando ainda a prótese total como um fator importante na etiologia da EP e tendo conhecimento de que o fungo tem a capacidade de aderir a superfície, a adesão da *Candida* spp. também foi avaliada neste estudo. O acrílico das próteses tem um importante papel no aumento do risco de colonização e/ou proliferação de *Candida* spp., pois podem atuar como um reservatório de microrganismos^{50,70}. A aderência do fungo na superfície de acrílico da prótese total parece ser o passo inicial para a colonização e subsequente invasão dos tecidos bucais^{38,40}. A adesão pode variar dependendo da espécie do fungo e do tipo de substrato, como constatado por Luo e Samaranayake⁶⁶ (2002), que verificaram que *C. glabrata* aderiu em maior quantidade quando

comparada à *C. albicans*, e por Radford et al.⁹³ (1998), que verificaram que superfícies rugosas promovem maior grau de adesão de *C. albicans* quando comparada à superfícies polidas.

Nossos resultados não demonstraram diferenças estatísticas na adesão de *C. albicans* entre os grupos controle e teste. Embora *C. albicans* apresentasse valores numericamente maiores, também não foi obtida diferença estatística entre a aderência de *C. albicans* e *C. tropicalis* nos corpos de prova de resina avaliados. Panagoda et al.⁸⁷ (2001) também não observaram diferenças de adesão entre espécies, embora estivessem avaliando *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Luo e Saramanayake⁶⁶ (2002) relataram que *C. glabrata* mostrou maior adesão quando comparada à *C. albicans*. Estes dois últimos estudos relacionam a capacidade de adesão da *Candida* à hidrofobicidade da superfície celular. Esta hidrofobicidade pode variar com a temperatura, resultando no aumento ou diminuição da adesão⁶⁶. Também não encontramos diferença estatística para a quantidade de células aderidas e o diagnóstico de EP, considerando o isolado escolhido para o teste de adesão e sua respectiva origem, isto é, se o indivíduo portador daquele isolado apresentava EP ou não.

Sabemos também que há diferenças na adesão entre diferentes tipos de materiais^{50,103}, inclusive entre as resinas termo e autopolimerizável. No entanto, optamos por avaliar a adesão apenas na resina termopolimerizável pois esta é utilizada para a confecção de

próteses totais. Outro fator importante para as diferenças encontradas nos estudos de adesão é o fato da superfície ser polida ou não⁹³. Ramage et al.⁹⁴ (2004), relatam que a superfície rugosa permite maior penetração do fungo, dificultando a higienização. Entretanto, sabemos que a superfície interna da prótese total não pode ser polida, pois afetaria diretamente a retenção e estabilidade da mesma.

Outros estudos avaliam ainda a influência da saliva na adesão do fungo na resina, e embora este fator não tenha sido avaliado em nosso estudo, encontramos resultados contraditórios. No estudo de Vasilas et al.¹¹³ (1992), foi relatado aumento da adesão na presença de saliva e outros estudos^{70,93} relatam a diminuição da adesão na presença de saliva. Radford et al.⁹³ (1998) explicam que a presença da saliva promove diminuição do efeito de rugosidade da superfície do acrílico, diminuindo também as diferenças de energia de superfície livre entre os materiais.

Tendo em vista que o desequilíbrio na relação hospedeiro-fungo que resulta na instalação da EP, parece estar mais fortemente relacionado com fatores do hospedeiro, e que este ainda possa colaborar com a capacidade de adesão da *Candida* spp., fornecendo possíveis receptores para o fungo romper as barreiras de proteção da mucosa bucal, este estudo também avaliou a adesão de *Candida* spp. segundo o tipo sanguíneo dos indivíduos.

Shay et al.¹⁰⁵ (1997) relatam que o tipo sanguíneo do indivíduo pode influenciar na susceptibilidade de infecção por *Candida* por interferir

na capacidade do microrganismo de aderir às células epiteliais. O acúmulo de biofilme, a maior frequência e a maior severidade da EP têm sido associados ao fenótipo O, de acordo com estudo de Lamey et al.⁶³ (1991). Apesar dessa afirmação, acreditamos que embora o acúmulo de biofilme possa ser maior em um determinado grupo sanguíneo, este é um fator que pode ser controlado pela adequada higienização da prótese e da mucosa bucal.

Em nosso grupo controle encontramos a mesma porcentagem (27,8%) para os dois grupos sanguíneos O Rh+ e A Rh+. O grupo teste apresentou prevalência do grupo O Rh+ (45%) seguido do grupo A Rh+ (31,7%). Esse era um resultado esperado uma vez que a maior parte da população de Araraquara faz parte destes dois grupos. Para os fenótipos ABO e RhD encontramos diferença estatisticamente significativa entre o grupo O Rh+ e a presença de EP e entre o grupo A Rh+ e a detecção de *Candida* spp. Embora nossos resultados concordem com os de Nikawa et al.⁸¹ (1991), que relatam que o grupo O apresentou maior propensão de EP, discordam, do relatado por Buford-Mason et al.¹⁹ (1988), e Ben-Aryeh et al.⁹ (1995), que encontraram uma alta porcentagem de *Candida* spp. no grupo O.

Para os fenótipos Lewis, tanto o grupo controle quanto o grupo teste apresentaram prevalência de Le^b, ou seja, secretores (83,3% e 66,7%, respectivamente), identificação também predominante na população em geral. Não encontramos correlação estatística entre o

estado secretor e a presença de EP, assim como entre o estado secretor e a detecção de *Candida* spp., devido a baixa prevalência de não secretores na nossa amostra (5,5% no grupo controle e 10% no grupo teste).

Entretanto, nos parece relevante o fato de que entre os indivíduos secretores, 60% apresentavam EP, enquanto entre os não secretores o percentual foi de 50%. A detecção de *Candida* spp. em nosso estudo foi de 80% nos indivíduos secretores do grupo teste e 46,7% do grupo controle, enquanto nos não secretores foi de 83,3% no grupo teste e 100% no grupo controle, embora este último valor corresponda a um único indivíduo (não secretor e positivo para detecção de *Candida* spp.). Percentualmente estes resultados sugerem que o estado secretor não influencia a presença de EP, nem a detecção de *Candida* spp., concordando com os resultados de Shin et al.¹⁰⁷ (2003), embora outros relatem correlação dos indivíduos não secretores com a presença da EP^{63,78} e com a detecção de *Candida* spp.^{9,19,28,69,112}. Estudo sobre candidose vaginal²¹ também relata maior número de infecções em mulheres não secretoras de Lewis.

Considerando a combinação dos sistemas sanguíneos ABO, RHD e Lewis, encontramos maior frequência de indivíduos do grupo O Rh positivo Le (a- b+). Destes 72,2% apresentaram EP e em 88,9% foi detectado *Candida* spp.. Estas frequências poderiam sugerir que indivíduos pertencentes a combinação destes grupos são mais

susceptíveis a EP e a colonização por *Candida* spp., embora os resultados não tenham sido estatisticamente significantes. Estudos prévios^{9,19} relatam maior susceptibilidade à indivíduos do grupo O Le (a+ b-). A sugestão de que antígenos Le^a atuem como receptores para *Candida* spp.^{69,107} não se confirmou neste estudo.

Considerando ainda a importância do hospedeiro no desenvolvimento e/ou manutenção da EP, outras características foram avaliadas. Neste ínterim, embora a literatura^{4,67,84,117} relate que a EP é mais comum no sexo feminino, em nosso estudo, não encontramos diferença estatística entre os gêneros e o diagnóstico clínico de EP nos indivíduos usuários de prótese total, concordando com Vigild et al.¹¹⁴ (1987), Barbeau et al.⁵ (2003) e d'Avila³⁴ (2003). Também não encontramos diferença estatística entre os gêneros e a detecção de *Candida* spp., tanto no grupo controle quanto no grupo teste, apesar da alta prevalência de mulheres (66,7% e 78,3%, respectivamente). Estas prevalências são semelhantes às encontradas em outros estudos tais como 67% na amostra de Vigild et al.¹¹⁴ (1987), 82,6% Cumming et al.²⁸ (1990), 69,2% Crockett et al.²⁵ (1992), 61,4% Blair et al.¹² (1995), 62,67% Jeganathan et al.⁵² (1997) e 71,49% Budtz-Jorgensen et al.¹⁸ (2000).

Arendorf e Walker⁴ (1987) e Vigild et al.¹¹⁴ (1987), relatam que a prevalência da EP diminui com a idade do indivíduo. Este último relata em seu estudo uma prevalência de 46% aos 75 anos e 22% aos 85 anos. Discordando destes, Wilson¹¹⁷ (1998) e Barbeau et al.⁵ (2003) relatam

que a prevalência da EP aumenta com a idade do indivíduo, devido ao declínio das defesas imunes, podendo ser considerada como um fator predisponente para a EP. Em nosso estudo consideramos apenas a média de idade em cada grupo, pois acreditamos que a idade não está diretamente relacionada à EP, uma vez que idade avançada não é sinônimo de doença. Consideramos ainda que o aumento na expectativa de vida observado na população está intimamente relacionado à melhora na qualidade de vida da mesma. Assim, a média de idade no nosso grupo controle foi de $44,72 \pm 6,91$ anos, e para o grupo teste foi de $62,48 \pm 11,34$ anos. O nosso grupo teste apresentou média de idade semelhante a relatos de estudos prévios^{10,25,52,60}, embora inferior a outros, que apresentaram média de aproximadamente 80 anos^{12,18,28,36,43,104}, entre indivíduos institucionalizados ou não.

Outro fator a ser considerado na etiologia ou predisponente para a EP é a presença de doenças sistêmicas e/ou uso de medicamentos nos usuários de prótese total^{4,5}. Estas foram condições comuns em nossa amostra do grupo teste. Dessa forma, 73,3% dos indivíduos relataram alguma doença sistêmica, sendo as do sistema cardiovascular as mais freqüentes, predominantemente a hipertensão. Este resultado pode ser considerado próximo aos 81% encontrado por Dormenval et al.³⁶ (1999). Öhman et al.⁸³ (1995), também relataram alta prevalência de doenças cardiovasculares, principalmente as doenças coronarianas (64%) e a

hipertensão (58%), embora Kuc et al.⁵⁹ (1999) relatem uma frequência bem inferior (47,6%).

Avaliando nosso grupo controle, entre os 55,5% dos indivíduos que apresentaram doença sistêmica, *Candida* spp. foi detectada em 50%, uma frequência menor do que o grupo teste (59,1%), como também relatado por Arendorf e Walker³ (1980). Na avaliação do grupo teste, entre os 73,3% dos indivíduos que apresentaram doença sistêmica, 59,1% apresentaram EP e em 75% foi detectado *Candida* spp.. No entanto, entre os 26,7% que não apresentaram doença sistêmica, encontramos também alta incidência da EP (62,5%) e *Candida* spp. (87,5%). Não encontramos diferença estatística tanto no diagnóstico de EP, quanto na detecção de *Candida* spp., entre os indivíduos com ou sem doença sistêmica. Cumming et al.²⁸ (1990) e d'Avila³⁴ (2003), apesar de não encontrarem diferença estatística entre a presença de doenças sistêmicas e a EP, relatam diferença estatisticamente significativa para a detecção de *Candida* spp. entre os indivíduos saudáveis e os que apresentavam doença. Embora nosso estudo não apresentasse diferença estatística entre os indivíduos que apresentaram ou não doença sistêmica, a sua presença foi correlacionada com a detecção de *Candida* spp., diferindo do relato por Öhman et al.⁸³ (1995) e Kuc et al.⁵⁹ (1999) que não encontraram correlação entre a presença de doenças sistêmicas e a detecção de *Candida* spp..

Em nossa amostra o uso de medicamentos foi relatado por 70% dos indivíduos, sendo o mais utilizado os medicamentos do grupo dos anti-hipertensivos. Estes medicamentos podem induzir a xerostomia, a qual associada à presença da prótese (que modifica o microambiente oral com a queda do pH), e ao ambiente anaeróbio que favorece o crescimento de *Candida* e outros microrganismos¹⁰⁵, conduzem a um agravamento do quadro e torna o indivíduo mais susceptível à infecções fúngicas.

Considerando o uso de medicamentos, encontramos que em nosso grupo controle, 50% dos indivíduos relataram fazer uso de alguma medicação, e em 44,4% destes foi detectado *Candida* spp.. Este valor pode ser considerado bem inferior quando comparado ao nosso grupo teste, no qual 70% relataram fazer uso de alguma medicação, sendo que 61,9% apresentaram EP e em 73,8% foi detectado *Candida* spp.. Não encontramos diferença estatística significativa no diagnóstico clínico de EP ou na detecção de *Candida* spp. entre os indivíduos que faziam uso de medicamentos ou não. Vigild et al.¹¹⁴ (1987) e Cumming et al.²⁸ (1990) também não encontraram diferença estatística entre uso de medicação e a presença da EP. Entretanto, nossos resultados mostraram correlação entre uso de medicação e detecção de *Candida* spp., assim como Kreher et al.⁵⁸ (1991), que encontraram ainda correlação entre uso de medicamento e presença de EP, e ao contrário de Kuc et al.⁵⁹ (1999), que

não encontraram correlação entre uso de medicação e incidência de *Candida* spp..

O tabaco, por meio do cigarro, também é um fator relacionado ao hospedeiro e considerado como predisponente para a EP⁵. Na opinião de Kreher et al.⁵⁸ (1991) indivíduos fumantes possuem o dobro de possibilidade de apresentar EP. A prevalência de fumantes em nossa amostra foi pequena (21,7%), porém apresentaram uma considerável incidência de EP (53,8%) e uma alta detecção de *Candida* spp. (92,3%). Crocket et al.²⁵ (1992) relatam prevalência semelhante (60%) de indivíduos fumantes com EP, embora em estudo de Cumming et al.²⁸ (1990) a prevalência foi bem aquém (14%). Arendorf e Walker³ (1980) e Oliver e Shillito⁸⁶ (1984) também relatam alta detecção de *Candida* spp. em indivíduos fumantes. Entretanto, este fator não foi estatisticamente significativo em nosso estudo, quando relacionado ao diagnóstico da EP, concordando com estudo anterior³⁴, embora outros autores^{28,108} tenham encontrado esta correlação. Também não encontramos resultados estatisticamente significantes quando relacionamos o fumo à detecção de *Candida* spp., concordando com Oliver e Shillito⁸⁶ (1984).

Frente ao aumento da expectativa de vida e a grande demanda por tratamento reabilitador com prótese total, seja por limitações sistêmicas ou econômicas, acredita-se que essa necessidade persistirá por muitos anos¹⁰⁵. Assim, esperamos que a patogênese da EP possa ser melhor esclarecida. Estudos que já consideram outros fatores de virulência e

avaliam características como a superfície celular da *Candida*, hidrofobicidade da superfície celular, energia livre da superfície do acrílico, adsorção de proteínas da saliva pelo acrílico, ou mesmo associação de *Candida* com outros microrganismos, talvez possam ajudar no esclarecimento desta patogênese.

Entretanto, consideramos que, diante dos resultados obtidos neste estudo, tanto para as variáveis clínicas quanto para as laboratoriais, suas correlações, a comparação com os resultados encontrados na literatura e independente das técnicas utilizadas, o hospedeiro deve ser visto como a variável mais importante. Assim, acreditamos que este determina a instalação de uma patologia ou não, é capaz de adaptações, subjetiva resultados, podendo explicar ainda a variedade de resultados na literatura e devendo conduzir o foco para novos estudos relacionados à EP.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- os indivíduos com EP apresentaram maior diversidade de espécies de *Candida*
- a presença de EP foi associada com os indivíduos pertencentes ao grupo sanguíneo O Rh + e com a detecção de *Candida* spp. no palato
- a detecção de *Candida* spp. foi associada com a presença de EP, com a presença de doenças sistêmicas, uso de medicação, higiene e qualidade das próteses totais e com os indivíduos do grupo A Rh+
- não foi encontrado um perfil genotípico de *Candida* spp. ou quaisquer características de adesão relacionada a EP.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS*

1. AIANAMO, J.; BAY, Y. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, London, v.25, n. 4, p.229-235, Dec. 1975.
2. AL-KARAAWI, Z.M. et al. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 17, n. 1, p. 44-49, Feb. 2002.
3. ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. *Candida albicans*: its association with dentures, plaque and the oral mucosa. **J. Dent. Assoc. South Africa**, Pretória, v. 2, n.3, p. 563-568, Aug. 1980.
4. ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Denture stomatitis: a review. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 14, n. 2 , p. 217-227, May 1987.
5. BARBEAU, J. et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 95, n.1, p.51-59, Jan. 2003.
6. BEAUSEJOUR, A. et al. Proteolytic activation of the inteleukin-1 β precursor by *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n.2, p. 676-681, Feb.1998.
7. BECKER, K. et al. Molecular genotyping of *Candida* species with special respect to *Candida (Torulopsis) glabrata* strains by arbitrarily primed PCR. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 49, n. 6, p.575-581, June 2000.
8. BEIGHTON, D. et al. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 11, p. 3025-3027, Nov. 1995.
9. BEN-ARYEH, H. et al. Oral *Candida* carriage and blood group antigen secretor status. **Mycoses**, Berlin, v. 38, n.9/10, p. 355-358, Sept./Oct. 1995.
10. BERGENDAL, T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 90, n. 3, p. 227-238, June 1982.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

11. BLACKWELL, C.C. The role of ABO blood groups and secretor status in host defences. **FEMS Microbiol. Immunol.**, Amsterdam, v. 1, n. 6/7, p. 341-349, June 1989.
12. BLAIR, Y. et al. Microbiological assessment of denture hygiene among patients in longstay and daycare community places. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 23, n. 2, p.100-103, Apr. 1995.
13. BOLDO, X.M. et al. Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis analyses. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.41, n.10, p. 4799-4804, Oct. 2003.
14. BUDTZ-JØRGENSEN, E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 96, n. 3, p. 474-479, Mar. 1978.
15. BUDTZ-JØRGENSEN, E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. A review article. **J. Oral Pathol.**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 65-80, Apr. 1981.
16. BUDTZ-JØRGENSEN, E.; STENDERUP, A.; GRABOWSKI, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 3, n. 3, p. 115-119, May 1975.
17. BUDTZ-JØRGENSEN, E.; THEILADE, E.; THEILADE, J. Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Oslo, v. 91, n. 2, p. 134-142, Apr. 1983.
18. BUDTZ-JØRGENSEN, E. et al. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 28, n. 2, p. 141-149, Apr. 2000.
19. BUFORD-MASON, A.P.; WEBER, J.C.P.; WILLOUGHBY, J.M.T. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in healthy subjects. **J. Med. Vet. Mycology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 49-56, Feb. 1988.

20. CANNON, R.D. et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res.**, Alexandria, v. 74, n. 5, p.1152-1161, May 1995.
21. CHAIM, W.; FOXMAN, B.; SOBEL, J.D. Association of recurrent vaginal candidiasis and secretory ABO and Lewis phenotype. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 176, n. 3, p.828-830, Sept. 1997.
22. CHONG, P.P. et al. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. **J. Med. Microbial.**, London, v. 52, p. 657-666, Aug. 2003.
23. CIRAK, M.Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. Use molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.8, p. 1027-1032, Dec. 2003.
24. COLEMAN, D. et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV –infected and AIDS patients. **Oral Dis.**, Copenhagen, v.3, suppl. 1, p.96-101, May 1997
25. CROCKETT, D.N.; O'GRADY, J.F.; READE, P.C. *Candida* species and *Candida albicans* morphotypes in erythematous candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 73, n. 5, p. 559-563, May 1992.
26. CROSS, L.J. et al. A comparison of fluconazole and itraconazole in the management of denture stomatitis: a pilot study. **J. Dent.**, Guildford, v. 26, n. 8, p. 657-664, Nov. 1998.
27. CROSS, L.J. et al. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 97, n. 3, p..351-358, Mar. 2004.
28. CUMMING, C.G. et al. Denture stomatitis in the elderly. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 5, n. 2, p. 82-85, Apr. 1990.

29. DABELSTEEN, E. ABO blood group antigens in oral mucosa. What is new? **J. Oral Pathol. Med.**, St. Louis, v. 31, n.2 p. 65-70, Feb. 2002.
30. DAR-ODEH, N.S.; SHEHABI, A.A. Oral candidosis in patients with removable dentures. **Mycoses**, Berlin, v. 46, n.5-6, p. 187-191, June 2003.
31. DARWAZEH, A.M.; AL-REFAI, S.; AL-MOJAIWEL, S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 86, n. 4, p. 420-423, Oct. 2001.
32. DASSANAYAKE, R.S; SAMARAYAKE, L.P. Characterization of the genetic diversity in superficial and systemic human isolates of *Candida parapsilosis* by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **APMIS**, Copenhagen, v.108, n.2, p.153-160, Feb. 2000.
33. DASSANAYAKE, R.S; SAMARAYAKE, L.P. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. The basics. **Methods Mol. Biol.**, Clifton, v. 226, n.2, p.117-122, Aug. 2003.
34. D'AVILA, S. **Avaliação clínica e micológica de pacientes portadores de prótese total superior**. 2003. 124f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
35. DIAZ-GUERRA, T.M et al.. Molecular characterization by PCR-fingerprinting of *Candida dubliniensis* strains isolated from two HIV-positive patients in Spain. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.35, n.2, p.113-119, Oct. 1999
36. DORMENVAL, V.; MOJON P.; BUDTZ-JØRGENSEN, E. Associations between self-assessed masticatory ability, nutritional status, prosthetic status and salivary flow rate in hospitalized elders. **Oral Dis.**, Copenhagen v. 5, n. 1, p. 32-38, Jan. 1999.
37. EDGERTON, M.; LEVINE, M.J. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 68, n. 4, p. 638-691, Oct. 1992.

38. ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 43, n. 12, p.999-1007, Dec. 1998.
39. FOTOS, P.G.; HELLSTEIN, J.W.; VICENT, S.D. Oral candidosis revisited. **Gen. Dent.**, Chicago, v. 39, n. 6, p. 422-430, Nov./Dec. 1991.
40. FUKAZAWA, Y.; KAGAYA, K. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxford, v.35, n. 2, p.87-99, Mar./Apr. 1997.
41. GALES, A.C. et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and α -methyl-d-glucoside as determined with API 20C AUX and VITEK YBC systems. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 12, p. 3804-3808, Dec. 1999.
42. GOLECKA, M. et al. Candida-associated denture stomatitis in patients after immunosuppression therapy. **Transplant. Proc.**, New York, v. 38, n.1, p. 155-156, Jan./Feb. 2006.
43. GORNITSKY, M. et al. A clinical and microbiological evaluation of denture cleansers for geriatric patients in long-term care institutions. **J. Can. Dent. Assoc.**, Toronto, v. 68, n. 1, p. 39-45, Jan. 2002.
44. GREEN, C. The ABO, lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. **FEMS Microbiol. Immunol.**, Amsterdam, v. 1, n.6/7, p. 321-330, June 1989.
45. GUGGENHEIMER, J. et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies. II. Prevalence and characteristics of *Candida* and candidal lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 89, n. 5, p. 570-576, May 2000.
46. HANNULA, J. et al. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, n.3, p.176-182, June 1999.
47. HANNULA, J. et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and

- patients with chronic candidosis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n.4, p. 238-244, Aug. 2000.
48. HANNULA, J. et al. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 12, n. 6, p. 358-365, Dec. 1997.
49. HANNULA, J. et al. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.16, n. 2, p. 113-118, Apr. 2001
50. HE, X.Y. et al. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. **Mycoses**, Berlin, v. 49, n.2, p. 80-84, Mar. 2006.
51. HOWELL, S.A. et al. Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of *Candida albicans*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.22, n.2, p.125-128, Feb. 1996.
52. JEGANATHAN, S.; PAYNE, J.A.; THEAN, H.P.Y. Denture stomatitis in an elderly edentulous Asian population. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 24, n.6, p. 468-472, June 1997.
53. JENNINGS, K.J.; MacDONALD, D.G. Histological, microbiological and hematological investigations in denture-induced stomatitis. **J. Dent.**, Guildford, v. 18, n. 2, p. 102-106, Aug. 1990.
54. JORGE, A.O.C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-285, Out./Dez. 1997.
55. JORGE-JÚNIOR, J. **Influência de fatores locais e sistêmicos na presença do gênero *Candida* na boca de idosos.** 1996. 160f. Tese (Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1996.
56. KLEIN, H.; PALMER, C.E.; KNUTSON, J.W. Studies on dental caries. I. Dental status and dental needs of elementary school-children. **Public Health Rep.**, Chicago, v.53, n.7, p. 751-765, May 1938.

57. KOOPMANS, A.S.; KIPPUW, N.; DE GRAAFF, J. Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 67, n. 9, p. 1246-1250, Sept. 1988.
58. KREHER, J.M. et al. Oral yeasts, mucosal health, and drug use in an elderly denture-wearing population. **Special Care Dent.**, Chicago, v.11, n. 6, p.222-226, Nov./Dec. 1991.
59. KUC, I.M.; SAMARANAYAKE, L.P.; VAN HEYST, E.N. Oral health and microflora in an institutionalized elderly population in Canada. **Int. Dent. J.**, London, v. 49, n.1, p. 33-40, Feb. 1999.
60. KULAK, Y.; ARIKAN, A.; KAZAZOGLU, E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 24, n.10, p. 788-790, Oct. 1997.
61. KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 300-304, Mar. 2002.
62. KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts. A taxonomic study.** Amsterdam: Elsevier, 1998.
63. LAMEY, P.J. et al. Chronic hyperplastic candidosis and secretor status. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 64-67, Feb. 1991.
64. LEUNG, W.K. et al. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2219-2226, June 2000.
65. LIAN, C. et al. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. **Mycoses**, Berlin, v. 47, n. 11/12, p. 495-502, Dec. 2004.
66. LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. **APMIS**, Copenhagen, v.110, n. 9, p.601-610, Sept. 2002.

67. LYNCH, D. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 78, n. 2, p. 189-193, Feb. 1994.
68. MANFREDI, M. et al. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. **Oral Microbiol Immunol.**, Copenhagen v. 17, n. 3, p. 181-185, June 2002.
69. MAY, S.J.; BLACKWELL, E.; WEIR, D.M. Lewis^a blood group antigen of non-secretors: a receptor for *Candida* blastopores. **FEMS Microbiol. Immunol.**, Amsterdam, v. 1, n.6/7 p. 407-410, June 1989.
70. MAZA, J.L. et al. *Candida albicans* adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole saliva. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 94, n. 5, p. 589-592, Nov. 2002.
71. McCULLOUGH, M.J.; ROSS, B.C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, St. Louis, v. 25, n. 2, p. 136-144, Apr. 1996.
72. McFARLANE, T.W.; SAMARANAYAKE, L.P. **Clinical oral microbiology**. Cornwall: Wright, 1989.
73. McMULLAN-VOGEL, C.G. et al. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 183-189, June 1999.
74. METZGAR, D. et al. Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre and posttreatment isolates of *Candida* spp from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.8, p.2308-2313, Aug. 1998.
75. MILAN, E. P. et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-

- positive and AIDS patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.41, n.1/2, p. 29-35, Sept./Oct. 2001.
76. MIRANDA, E.T. **Identificação de espécies de Candida de diferentes unidades hospitalares por técnicas clássicas e moleculares. Padrão genotípico e de suscetibilidade a drogas antifúngicas.** 2001. 115f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
77. MOSKONA, D.; KAPLAN, I. Oral lesions in elderly denture wearers. **Clin. Prevent. Dent.**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p.11-14, Sept./Oct. 1992.
78. NERY, E.O. et al. Influência dos antígenos do sistema ABO(H) na saliva sobre a presença do gênero Candida na cavidade bucal. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.8, n.1, p.37-41, Jan./Mar.1994.
79. NEWTON, A.V. Denture sore mouth. A possible etiology. **Br. Dent. J.**, v. 112, London, p. 357-360, May 1962.
80. NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMAMOTO, T. Denture plaque: past and recent concerns. **J. Dent.**, Guildford, v. 26, n. 4, p. 299-304, May 1998.
81. NIKAWA, H. et al. Denture stomatitis and ABO blood types. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 66, n. 3, p. 391-394, Sept. 1991.
82. ODDS, F.C. **Candida and candidosis.** 2nd ed. London: Boulliere Tindall, 1988. 468 p.
83. ÖHMAN, S.C. et al. The prevalence of *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* species, and *Candida* species and their relation to oral mucosal lesions in a group of 79-year-olds in Göteborg. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 53, n. 1, p. 49-54, Feb. 1995.
84. OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeasts infections. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 48, n. 1, p. 71-74, Feb. 1990.

85. OLIVEIRA, T.R.C. et al. Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 219-224, Jul./Set. 2000.
86. OLIVER, D.E.; SHILLITOE, E.J. Effect of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 13, n. 3, p. 265-270, June 1984.
87. PANAGODA, G.J.; ELLEPOLA, A.N.B; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hidrophobicity. **Mycoses**, Berlin, v. 44, n.1/2, p. 29-35, Mar. 2001.
88. PINTO, P.M. et al. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using Random Amplified polymorphic DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n.2, p. 147-152, Mar. 2004.
89. PINTO, V.G. **Saúde bucal: odontologia social e preventiva**. São Paulo: Ed. Santos, 1989.
90. PIRES, F.R. et al. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 29, n.11 p. 1115-1119, Nov.2002.
91. QI, Q.G.; HU, T.; ZHOU, X.D. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different ages in China. **J. Oral Pathol. Med.**, St. Louis, v. 34, n.6, p. 352-356, July 2005.
92. RADFORD, D.R.; CHALLACOMBE, S.J.; WALTER, J.D. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials *in vivo* and *in vitro*. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 10, n. 1, p. 99-116, 1999.
93. RADFORD, D.R. et al. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. **J. Dent.**, Guildford, v.26, n.7,p.577-583, Sept. 1998
94. RAMAGE, G. et al. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 98, n.1, p. 53-59, July 2004.

95. RAMFJORD, S.P. The Periodontal Disease Index (PDI). **J. Periodontol.**, Chicago, v.38, n.6, p.602-610, Nov./Dec. 1967.
96. RISE, J. An approach to epidemiologic assessment of complete dentures. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 37, n. 1, p. 57-63, Feb. 1979.
97. SAMARANAYAKE, L.P. Host factors and oral candidosis. In: SAMARANAYAKE, L.P.; MCFARLANE, T.W. **Oral candidosis**. Cambridge: Wright, 1990. cap. 5, p. 66-103.
98. SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. **Clinical oral microbiology**. Cornwall: Wright, 1989. 284p.
99. SAMARANAYAKE, L. P.; MACFARLANE, T. W. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 25, n.8/9, p.603-609, 1980.
100. SAMARANAYAKE, L.P. et al. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeasts, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 15, n. 7, p. 386-388, Aug. 1986.
101. SAMARANAYAKE, L. P. et al. "Genotypic shuffling" of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 52, p. 349-359, Apr. 2003.
102. SAN MILLÁN, R. et al. Effect of salivary IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. **Microbiology**, Reading, v. 146, v. 9, p. 2105-2112, Sept. 2000.
103. SANTARPIA III, R.P. et al. An in vivo method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 63, n. 4, p. 437-443, Apr. 1990.
104. SCHOU, L.; WIGHT, C.; CUMMING, C. Oral hygiene habits, denture plaque, presence of yeasts and stomatitis in institutionalized elderly in

- Lothian, Scotland. **Commun. Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 85-89, Apr. 1987.
105. SHAY, K.; TRUHLAR, M.R.; RENNER, R.P. Oropharyngeal candidosis in the older patient. **J. Am. Geriatr. Soc.**, Malden, v. 45, n. 7, p. 863-870, July 1997.
106. SHEPERD, M.G. The pathogenesis and host defense mechanisms of oral candidosis. **N. Z. Dent. J.**, Auckland, v. 82, n.369, p.78-81, July 1986.
107. SHIN, E.S. et al. The relationship between oral *Candida* and the secretor status of blood group antigens in saliva. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 96, n.1, p. 48-53, July 2003.
108. SHULMAN, J.D.; RIVERA-HIDALGO, F.; BEACH, M.M. Risk factors associated with dentures stomatitis in the United States. **J. Oral Pathol. Med.**, St. Louis, v. 34, n.6, p. 340-346, July 2005.
109. SOLL, D.R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 13, n. 2, p.332-370, Apr. 2000.
110. STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 48, n.1, p. 3-10, Feb. 1990.
111. SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 2, p. 329-334, Feb. 1998.
112. THOM, S.M. et al. Non-secretion of blood group antigens and susceptibility to infection by *Candida* species. **FEMS Microbiol. Immunol.**, Amsterdam, v. 1, n. 6/7, p. 401-406, June 1989.
113. VASILAS, A. et al.. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic *in vitro*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 613-622, Aug. 1992.
114. VIGILD, M. Oral mucosal lesions among institutionalized elderly in Denmark. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 15, n.6, p. 309-313, Dec. 1987.

115. WALTIMO, T. M. et al. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.16, n.2, p.106-112, Apr. 2001.
116. WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WHITTLE, T. A 2-year study of *Candida*-associated dentures stomatitis treatment in aged care subjects. **Gerodontol.**, London, v. 22, n. 3, p. 168-176, Sept. 2005.
117. WILSON, J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. **Br. Dent. J.**, London, v. 185, n. 8, p. 380-384, Oct. 1998.
118. YILDIRIM, M.S. et al. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 32, n.7, p. 518-525, July 2005.

ANEXO 1

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Avaliação de fatores relacionados a estomatite por prótese – análise molecular de *Candida* spp. e correlações clínicas”.

Pesquisador Responsável: Susana d’Avila

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome)_____

(idade)_____, (data de nascimento)_____,

(nacionalidade)_____, (profissão)_____

R.G._____, residente à _____

_____, na cidade de _____, Estado _____, PG_____

concordo em absoluta consciência com os procedimentos a que vou me submeter para coleta de informações e amostras (da boca, saliva e sangue) que tem por objetivo saber se existe ou não infecção causada pelo fungo *Candida* spp (conhecida como “sapinho”) em pacientes que utilizam dentadura. Esta pesquisa permitirá uma avaliação individual e da população local, podendo mostrar diferenças quanto ao tipo de espécie(s) presente(s) ou da causa entre os pacientes. Desta forma, o paciente que usa prótese total poderá ser beneficiado com tratamentos diferenciados e preventivos prescritos de acordo com suas necessidades, evitando uso de antifúngicos sem saber a necessidade, além da orientação de tratamento se a infecção existir, nos termos abaixo relacionados:

- 1- Esclareço que recebi explicação verbal e também por escrito de todas as informações sobre minha participação nesse trabalho científico, possuindo total liberdade para esclarecer dúvidas e/ou desistir da pesquisa a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização. Ao participar do estudo, receberei o tratamento proposto para coleta de material (da boca e da saliva, que será realizado na Faculdade de Odontologia, e de sangue que será realizado no Laboratório de Análises Clínicas UNESP/Araraquara com a finalidade de identificação do meu tipo sanguíneo) e para o tratamento da infecção, se a mesma existir, conforme o plano de tratamento proposto anteriormente;

- 2- Esclareço também que fui amplamente informado(a), verbalmente e por escrito, sobre os **BENEFÍCIOS** (detecção e tratamento de lesões causadas por *Candida* spp., instrução de higiene oral e da prótese, orientações gerais sobre a doença e colaboração na tentativa de evoluir as propostas de tratamento que existem atualmente para esta infecção) e **RISCOS** (inexistentes ao estudo, uma vez que todo material a ser utilizado será descartável ou esterilizado em autoclave, segundo as especificações técnicas e normas do Ministério da Saúde – Controle de infecções e a prática odontológica em tempos de AIDS: Manual de Condutas, Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 118p., impossibilitando a transmissão de doenças. Para possíveis reações adversas como hematoma, náuseas e vômitos, desmaio, convulsões, contrações musculares e espasmos, arritmias ou parada cardíaca, que possam ocorrer durante a coleta de sangue, a equipe do laboratório onde será feita a coleta possui treinamento, sendo capacitados a fornecer a assistência necessária e adequada).
- 3- Autorizo para fins de pesquisa, o uso, a divulgação e a publicação de todos os dados e resultados obtidos do relatório geral da pesquisa, mantendo em absoluto sigilo a minha identidade;
- 4- Fui esclarecido verbalmente e por escrito, pela aluna do Curso de Pós-Graduação, das vantagens e desvantagens da coleta de material, da coleta sangüínea e do tratamento da infecção (se a mesma existir);
- 5- Caso eu apresente qualquer dúvida ou necessite de algum atendimento relacionado a esta pesquisa poderei entrar em contato com a responsável (Susana d'Avila) pelos telefones (16) 3301-6428 (recado com Silvia) ou (16) 3301-6406 (recado com Lucia ou Marta). Para recursos ou reclamações devo contactar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa pelos telefones (16) 3301-6432 ou (16) 3301-6434.
- 6- Todas essas normas estão de acordo com o Código de Ética Profissional Odontológico, segundo a resolução C.F. 179/93 e com a Declaração de Helsinque II.

Portanto, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento informado, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 200__.

PACIENTE

PROF RESPONSÁVEL

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

RESUMO

D'AVILA, S. **Avaliação clínica e laboratorial da estomatite por prótese.** 2006. 153f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

RESUMO

Este estudo avaliou a estomatite por prótese total e as variáveis relacionadas à sua etiologia, considerando as características clínicas do indivíduo, as características micológicas e de adesão das espécies de *Candida* e o grupo sanguíneo dos indivíduos. Sessenta indivíduos portadores de prótese total superior (grupo teste) e 15 indivíduos não usuários de próteses removíveis (grupo controle) foram avaliados. As amostras micológicas foram coletadas da mucosa do palato, face interna da prótese e dorso da língua, por *imprint*. A identificação das espécies de *Candida* foi realizada por métodos clássicos (cultura) e moleculares (RAPD). A avaliação da qualidade das próteses totais foi realizada com base em cinco indicadores (defeitos, material, estabilidade, retenção e oclusão) e a da qualidade da higiene da prótese total, por meio da visualização do biofilme com o uso de evidenciador de placa. Não houve diferença significativa no diagnóstico de EP e na detecção de *Candida* spp. entre o gênero, hábito de fumar, presença de doença sistêmica, uso de medicamentos e hábitos de higiene (cavidade bucal e PT). A EP foi correlacionada com detecção de *Candida* spp. no palato e com indivíduos O Rh+. Entretanto não foi correlacionada com um perfil genotípico de *Candida* spp. ou uma espécie de *Candida*, com a quantidade de células aderidas nos corpos de prova de resina, com o estado secretor do indivíduo, com o uso contínuo ou qualidade e higiene da prótese total. A detecção de *Candida* spp. foi correlacionada com a presença de EP, com doença sistêmica, uso de medicamentos, com a qualidade e higiene das próteses e com indivíduos A Rh+. Com base nos resultados obtidos verificamos que a presença de estomatite por prótese total foi correlacionada com o grupo sanguíneo do indivíduo e com *Candida* spp.,

a qual também foi correlacionada com características do hospedeiro e da prótese total.

Palavras-Chave: Estomatite sob prótese; *Candida*; tipagem e reações cruzadas sangüíneas; técnicas de tipificação micológica, biologia molecular.

ABSTRACT

D'AVILA, S. **Clinical and laboratorial study of denture stomatitis.** 2006. 153f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

ABSTRACT

This study evaluated the denture stomatitis (DS) and clinical variables related with its etiology, considering the characteristics of clinical, mycological, adhesion profile and blood group of the subjects. 60 denture wearers (test group) and 15 subjects without removable appliances (control group) were evaluated. The mycological samples were taken from palate, denture and tongue by imprint method. The *Candida* species were identified by classical (culture) and molecular (RAPD) methods. The evaluation of denture quality was performed on basis of five parameters (defect, material, stability, retention, and occlusion) and the hygiene of the denture by means of plaque observation. Statistical difference was not observed between diagnosis of DS and *Candida* detection for gender, smoking, systemic diseases, medication, hygiene habits (oral cavity and denture). The DS was correlated with *Candida* spp. on the palate and with subjects O Rh+. However, there was no significance with genotypic profile with any species of *Candida* either clinical or molecular features. The detection of *Candida* was correlated with DS, systemic diseases, medication, quality and hygiene of denture in A Rh+ subjects. Within the limits of this study we conclude that denture stomatitis was correlated with blood group and *Candida* as well as the characteristics of the host and the denture.

Keywords: Denture stomatitis; *Candida*; blood group; mycological identification; molecular biology.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, Outubro de 2006.

SUSANA D'AVILA